



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

La expresión heteróloga del sistema de manosilación de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* revela que la *N*-aciltransferasa de lipoproteínas (Lnt) es dispensable en la vía de glicosilación en *Streptomyces coelicolor*.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LAURA ELENA CÓRDOVA DÁVALOS

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL

DRA. CLARA INÉS ESPÍTIA PINZÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO, D. F. ABRIL DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FINACIAMIENTO

Este trabajo fue realizado con el presupuesto obtenido para fondos mixtos de SEP-CONACyT siendo el donativo el número 103214 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Durante la realización del proyecto he sido beneficiada con la beca para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de becario 203334).

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Gabriela González Cerón

Apoyo técnico

Laboratorio del Dr. Luis Servín, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

LIIB. Julio Alberto Carrasco Vallejo

Apoyo técnico

Laboratorio del Dr. Luis Servín, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

QFB. Aurora Osorio

Apoyo técnico

Laboratorio de la Dra. Laura Camarena, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Biól. Luz María Chiu Velázquez

Apoyo técnico

Laboratorio de la Dra. María Sitges Berrondo, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Laura Ongay Larios y Biól. Guadalupe Códiz Huerta

Apoyo técnico

Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

M. en C. Ariana Zavala Moreno

Apoyo técnico

Departamento de Química de Biomoléculas, Instituto de Química, UNAM.

Dr. Miguel Angel Cevallos

Donación del sistema de doble híbrido de la adenilato ciclasa de *B. pertussis*
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Dra. Yolanda López Vidal

Donación de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Bibliotecarías Laura Tayde Velázquez Contreras, María Petra Muñoz García
y Lic. Lucía Brito Ocampo

Apoyo en la obtención de algunos manuscritos

Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

TABLA DE ABREVIATURAS

APA antígeno rico en alanina y prolina de *M. tuberculosis*

ConA Concanavalina A

D1 Ppm Dominio 1 de poliprenol fosfato manosa sintasa de *M. tuberculosis*

D2 Ppm Dominio 2 de poliprenol fosfato manosa sintasa *M. tuberculosis*

DPM Dolicol fosfato manosiltransferasa

GDP Guanosín di-fosfato

GDP-[¹⁴C]Man Guanosín di-fosfato - Carbono 14 – Manosa

Kb Kilobases

kDa Kilodaltons

Lnt *N*-aciltransferasa

pb pares de bases

Pmt Proteína manosiltransferasa

Ppm Poliprenol fosfato manosa sintasa

Ppm^{Sco} Poliprenol fosfato manosa sintasa de *S. coelicolor*

Ppm^{Mtu} Poliprenol fosfato manosa sintasa de *M. tuberculosis*

Sec Sistema de secreción

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Glicosilación de proteínas bacterianas.....	7
2.2 O-glicosilación en <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	9
2.3 O-glicosilación en <i>S. coelicolor</i> y <i>M. tuberculosis</i>	10
3. ANTECEDENTES	17
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1.1 Condiciones de crecimiento bacteriano.....	21
7.1.2 Obtención de mutantes nulas en los genes <i>sco3154</i> , <i>sco1423</i> y <i>sco1014</i> en <i>S. coelicolor</i>	21
7.1.3 Clonación de APA en pRT802.....	22
7.1.4 Clonación y mutagénesis de <i>ppm</i> (<i>Rv2051c</i>) de <i>M. tuberculosis</i> en pIJ6902.....	22
7.1.5 Clonación de <i>ppm</i> (<i>sco1423</i>) de <i>S. coelicolor</i> en pSET152.....	23
7.1.6 Clonación y mutagénesis de <i>pmt</i> (<i>Rv1002c</i>) de <i>M. tuberculosis</i> en pIJ6902.....	23
7.1.7 Clonación de <i>pmt</i> (<i>sco3154</i>) de <i>S. coelicolor</i> en pIJ6902.....	24
7.1.8 Construcción de <i>pmt</i> químeras.....	24
7.1.9 Clonación de los genes utilizados en el ensayo de doble híbrido.....	25
7.1.10 Fusión del epítotope HA de la hemaglutinina del virus <i>Haemphilus</i> <i>influenza</i> en el extremo carboxilo de la Pmt de <i>M. tuberculosis</i> y Pmt de <i>S. coelicolor</i> para inmunodetección.....	25
7.2 Electroforesis desnaturizante e Inmunorrélicas	26
7.3 Obtención de la fracción membranal de <i>S. coelicolor</i> para ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i> de Ppm y Pmt	26
7.4 Ensayo de transferencia de manosa al poliprenol de membranas de <i>S.</i> <i>coelicolor</i>	27
7.5 Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de la enzima Pmt en membrana de <i>S.</i> <i>coelicolor</i>	27

7.6 Ensayo de localización de la enzima Pmt en la membrana celular de <i>S. coelicolor</i>	28
7.7 Ensayo de actividad de β -galactosidasa (interacción entre ppmD1 y ppmD2 de <i>M. tuberculosis</i> y sus homólogos en <i>S. coelicolor</i>).....	29
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
8.1 La enzima Ppm de <i>S. coelicolor</i> (Ppm ^{Sc^o}) es requerida para la glicosilación de la proteína Apa de <i>M. tuberculosis</i>	30
8.2 Restablecimiento de la actividad de Ppm en <i>S. coelicolor</i> Δ ppm por la enzima Ppm de <i>M. tuberculosis</i>	34
8.3 El homólogo de la enzima Lnt de <i>M. tuberculosis</i> no es esencial para la glicosilación de la proteína Apa de en <i>S. coelicolor</i>	37
8.4 La manosiltransferasa de proteínas de <i>S. coelicolor</i> es requerida para la glicosilación de la proteína Apa.....	43
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	56
11. ANEXO 1. Tablas	60
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.....	60
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	61
Tabla 4. Oligos utilizados en este trabajo.....	62
Tabla 5. Construcciones realizadas en este trabajo.....	65
12. ANEXO 2. Alineamiento	60
13. ANEXO 3. Medios y soluciones	66
14. BIBLIOGRAFÍA	78

1. RESUMEN

El estudio del mecanismo de glicosilación de proteínas en *Streptomyces coelicolor* reveló que las enzimas poliprenol fosfato manosa sintasa (Ppm) y manosiltransferasa (Pmt) participan en la glicosilación de la proteína Apa de *Mycobacterium tuberculosis* y del receptor del fago Φ C31. La actividad de una cepa mutante en el gen *ppm* de *S. coelicolor* (*sco1423*) pudo ser restablecida por la Ppm de *M. tuberculosis* lo que nos indica que este punto en la vía de glicosilación está conservado entre ambas bacterias. La Ppm de *M. tuberculosis* está formada por dos dominios; el dominio amino-terminal es rico en segmentos transmembranales y tiene actividad de *N*-aciltransferasa de lipoproteínas (Lnt) mientras que el carboxilo-terminal es el que tiene la actividad de manosilación del poliprenol. La expresión solamente del dominio catalítico fue suficiente para restablecer la glicosilación en las mutantes en *ppm* de *S. coelicolor*. Al buscar el gen que codifica la proteína homóloga al dominio amino-terminal de la Ppm de *M. tuberculosis* en el genoma de *S. coelicolor*, se localizó el gen *sco1014* (*Int1*). Al ser eliminado este gen en *S. coelicolor* se observó que no tiene efecto sobre la glicosilación de proteínas. A diferencia de los dominios amino y carboxilo de la Ppm de *M. tuberculosis* que interaccionan físicamente, Ppm y Lnt1 de *S. coelicolor* no interaccionan. En el caso de la mutante en el gen de la Pmt de *S. coelicolor* (*sco3154*), la actividad de la manosiltransferasa no pudo ser restablecida por la Pmt de *M. tuberculosis*, aunque se demostró que sí se expresa y se localiza en la membrana, lo cual podría ser por una incapacidad de actuar en conjunto con el sistema Sec de *S. coelicolor*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Glicosilación de proteínas bacterianas.

La glicosilación de proteínas es una modificación postraduccional que consiste en la adición covalente de azúcares a las proteínas. Es un mecanismo usado por las células para diversificar las funciones de las proteínas ya que juega un papel crítico en la regulación de la estructura proteica, en las interacciones célula-célula y célula medio ambiente, modulación de la respuesta inmune, protección contra proteólisis, entre otras (Wang *et al.*, 2014).

De manera general, se han definido dos tipos de glicosilación: la *N*-glicosilación, en la cual los azúcares se unen al grupo γ -amido de la asparagina y la *O*-glicosilación, en la cual los azúcares se unen al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de la serina, treonina, hidroxiprolina, hidroxilisina y tirosina. La gran variedad de azúcares, los tipos de enlaces, así como su grado de ramificación incrementan la complejidad de esta modificación postraduccional (Ludwig *et al.*, 2006).

Los procariontes fueron considerados por mucho tiempo incapaces de glicosilar proteínas ya que esta actividad, en los eucariontes, se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, organelos que las células procariontes no tienen. Sin embargo, la presencia de proteínas glicosiladas ya ha sido demostrada en los dominios Bacteria y Arquea, por lo que la glicosilación de proteínas es una actividad conservada en los tres dominios de la vida, lo que resalta su gran importancia biológica (Iwashkiw *et al.*, 2013).

Los reportes de proteínas glicosiladas se han ido incrementando, tanto en bacterias patógenas como de vida libre. Por su interés biomédico, la caracterización de proteínas glicosiladas, así como el estudio de sus mecanismos de glicosilación se ha inclinado más hacia las bacterias patógenas (Schmidt *et al.*, 2003).

En general, las proteínas glicosiladas en bacterias se encuentran siempre expuestas en la superficie de las células, por lo que su función biológica podría tener un importante papel en la patogénesis. Se ha demostrado el papel de la glicosilación en la adhesión, en la protección contra la degradación proteolítica, en el incremento de la solubilidad, en la variación antigénica, en el ensamble de proteínas y en la protección contra el sistema inmune (Szymanski *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la habilidad de detectar proteínas glicosiladas, entender sus mecanismos de acción, así como las diversas implicaciones biológicas de la variabilidad en los carbohidratos, constituyen una nueva área de diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades; de ahí su importancia en el área biomédica.

En este trabajo nos enfocamos en la O-glicosilación, la cual ha sido descrita en algunos géneros de bacterias Gram positivas de alto contenido de G+C como son *Streptomyces spp.*, *Mycobacterium spp.* y *Corynebacterium spp.* Algunos aspectos de los mecanismos de glicosilación de estas bacterias tienen similitudes al sistema de O-manosilación de *S. cerevisiae* (Espitia *et al.*, 2010), por lo tanto, conocer los aspectos generales de la O-glicosilación en *S. cerevisiae* es fundamental para comprender los mecanismos de glicosilación en bacterias.

2.2 O-glicosilación en *Sacharomyces cerevisiae*

La O-glicosilación, en este caso, el estudio de los mecanismos de O-manosilación de proteínas ha sido ampliamente estudiado en *S. cerevisiae*. El sustrato para O-manosilar proteínas es GDP-manosa; este nucleótido activado proviene del intermediario de la glicólisis fructosa 6-fosfato. La enzima GDP-manosa pirofosforilasa (GMPP) sintetiza GDP-manosa a partir de GTP y manosa-1-fosfato. (Payton, *et al.* 1991) (figura 1). El mecanismo de manosilación inicia con la transferencia de GDP-manosa al lípido membranar dolicol-fosfato reacción llevada cabo por la enzima dolicol-fosfato-manosa sintasa (DPM) la cual está anclada al lado citoplasmático del retículo endoplásmico por su extremo carboxilo. Posterior a la manosilación, el dolicol se transloca al lumen del retículo endoplásmico por un mecanismo que no se conoce hasta la fecha (Aebi, 2013) y de esta forma, el dolicol-fosfato manosilado es usado como sustrato para transferir la manosa al grupo hidroxilo de serinas o treoninas de las proteínas. La transferencia de la manosa es llevada a cabo por la enzima dolicol-fosfato-manosa-proteína manosiltransferasa (PMT) (Lommel y Strahl, 2009); en *S. cerevisiae* existe una familia de siete miembros de transferasas encargadas de la manosilación de proteínas llamadas PMT (de sus siglas en inglés *Protein O-Mannosyl Transferase*) agrupadas en tres subfamilias: PMT1, PMT2 y PMT4.

En el caso de las levaduras, algunas manosiltransferasas son esenciales, probablemente porque proteínas glicosiladas forman parte estructural de la pared celular. Las proteínas que han sido manosiladas en el retículo endoplásmico por acción de las PMTs, son transferidas al aparato de Golgi donde se terminan de elongar las cadenas de azúcares. Las enzimas Ktr1p, Ktr3p y Mnt1p agregan las cadenas de manosas en enlaces α 1,2 usando

como sustrato GDP-manosa. Dichas enzimas se encuentran ancladas a membrana y su dominio catalítico se localiza en el carboxilo y, se asume, está orientado hacia el lumen del aparato de Golgi (Strahl *et al.*, 1999).

2.3 O-glicosilación en *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*

Streptomyces spp. es un género de bacterias aerobias y ubicuas en la naturaleza, particularmente en suelos (Kieser *et al.*, 2000). Los reportes de proteínas glicosiladas en *Streptomyces spp.* son escasos.

El hallazgo de un sistema de glicosilación de proteínas en *S. coelicolor* fue en realidad un evento inesperado, pues el grupo de la Dra. Smith estaba tratando de identificar al receptor del fago Φ C31 (un bacteriófago que infecta varias especies del género *Streptomyces spp.*) de *S. coelicolor* por medio de mutagénesis al azar con luz UV con la finalidad de aislar mutantes resistentes a la infección por el fago, por lo tanto, las cepas obtenidas resistentes a la infección del fago Φ C31 no eran infectadas al exponerlas directamente a partículas del fago pero sí podían ser transfectadas con el ADN del fago y así formar placas, resultado que sugería que dichas mutaciones habían afectado al receptor a través del cual el fago Φ C31 infecta a *S. coelicolor*. Cuando se analizaron las cepas resistentes a la infección por el fago Φ C31, se encontró que los genes mutados codificaban para dos proteínas homólogas a las del sistema de O-manosilación de levaduras, el gen *sco1423* codifica para una enzima homóloga a la Dolicol-fosfato-manosa sintasa (DPM) de *S. cerevisiae*, el otro gen identificado fue el *sco3154* el cual codifica para una enzima homóloga a la manosiltransferasa (PMT) de *S. cerevisiae*. De forma interesante, estas dos proteínas de *S. coelicolor* son homólogas a la poliprenol-fosfato-manosa sintasa (codificada por el gen *Rv2051c*) y a la manosiltransferasa (codificada por el gen *Rv1002c*) (ver figura 1) de *M. tuberculosis*, especie en la que ya se sabe existe la

manosilación de proteínas. Este resultado sugirió que es un requisito indispensable que el receptor del fago Φ C31 esté glicosilado para que se lleve a cabo la infección en *S. coelicolor* (Cowlshaw y Smith, 2001; 2002).

Hasta la fecha, no se ha encontrado el receptor del fago Φ C31, pero, en ese momento, el hecho de haber encontrado genes que participan en la vía de O-manosilación sugería que *S. coelicolor* debería tener varias proteínas O-manosiladas, entre ellas el receptor del fago.

El grupo de la Dra. Smith se planteó el objetivo de purificar proteínas manosiladas localizadas en la membrana celular, para lo cual se utilizó una columna de afinidad acoplada a la lectina concanavalina A (cuyo ligando son manosas) y geles de doble dimensión. De esta manera, se encontraron varias proteínas, una de ellas, la proteína más abundante con una masa molecular de aproximadamente 40kDa, se encontró glicosilada en la membrana de la cepa silvestre y no se observó glicosilada en la membrana de una cepa donde se ha eliminado el gen que codifica para la Pmt (*sco3154*) ni en membranas de una cepa donde se ha eliminado el gen que codifica para la Ppm (*sco1423*). Se realizó espectrometría de masas para identificar a esta proteína de 40kDa y se determinó que corresponde a la proteína PstS (gen *sco4142*) el cual forma parte de un operón de transporte de fosfato y tiene un homólogo en *M. tuberculosis*, la proteína antigénica de 38kDa, la cual también está glicosilada y se ha localizado en fracciones de membrana y en sobrenadantes (Wehmeier *et al.*, 2009).

Por lo tanto, en *S. coelicolor* se ha demostrado la participación de la Ppm (producto del gen *sco1423*) y la Pmt (producto del gen *sco3154*) en la glicosilación de la proteína PstS. Se ha demostrado que la Ppm es la enzima responsable de transferir manosa de GDP-manosa al poliprenol de *S.*

coelicolor, el cual es sólo uno, formado de nueve unidades de isopreno (C₄₅) (Wehmeier *et al.*, 2009).

La actividad de la enzima Pmt de *S. coelicolor* se evaluó mediante ensayos *in vitro* utilizando péptidos sintéticos y extractos membranales. Se utilizaron tres péptidos de diferentes regiones de la PstS de *S. coelicolor*, los cuales se eligieron con base en la presencia de sitios probables de glicosilación usando el programa de predicciones bioinformáticas NetOglyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Julenius *et al.*, 2005) y el péptido A3 de la proteína Apa de *M. tuberculosis* usado previamente en otros ensayos (Cooper *et al.*, 2002). Como resultado, se obtuvo una mayor actividad de manosilación sobre uno de los péptidos de la proteína PstS de *S. coelicolor* y menos actividad de manosilación sobre el péptido derivado de la proteína Apa de *M. tuberculosis* (Wehmeier *et al.*, 2009).

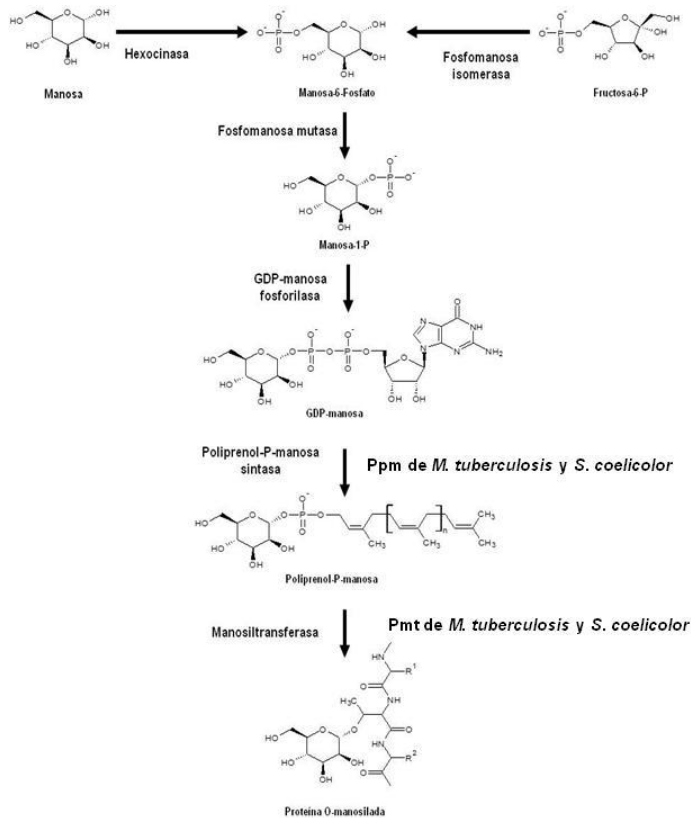


Figura 1. Ruta bioquímica de la biosíntesis del sustrato para la glicosilación GDP-manosa (Elaborada por Dr. Luis Servín)

Por otra parte, *M. tuberculosis* es una bacteria patógena, agente causal de la tuberculosis, respecto al estudio de las glicoproteínas hay varios reportes donde se detectan proteínas glicosiladas. Resultados obtenidos del glicoproteoma de *M. tuberculosis* (González-Zamorano *et al.*, 2009) revelaron que 41 proteínas son probables glicoproteínas. Las proteínas identificadas tienen asignadas varias funciones, algunas están implicadas en la degradación de compuestos, otras forman parte de sistemas de transporte, otro grupo pertenece a actividades metabólicas y de desintoxicación, otras están relacionadas con actividades de adhesión e invasión y otras más son de función desconocida. Resulta interesante observar que todas las proteínas manosiladas están modificadas además con lípidos y pertenecen al grupo de las lipoproteínas, es decir son lipoglicoproteínas, con excepción de

la proteína Apa de 45/47 kDa (González-Zamorano *et al.*, 2009) la cual ha sido utilizada en este trabajo como sustrato de glicosilación.

La glicoproteína de 45/47 kDa también llamada Apa (antígeno rico en Prolina y Alanina) está glicosilada con manosas unidas a las treoninas T10, T18 y T27 en el extremo amino y T277 en el extremo carboxilo, en enlaces α 1,2 (Dobos *et al.*, 1996). Se sabe que la proteína Apa induce la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y que al eliminar sus azúcares se pierde el efecto de inducción de la proliferación en dichas células, lo que indica que su parte inmunogénica son los carbohidratos (Horn *et al.*, 1999).

Poco se sabe de la funcionalidad de la proteína Apa en *M. tuberculosis*. Datos experimentales han sugerido la interacción de Apa con el receptor de células dendríticas DC-SIGN, el cual tiene actividad de lectina al reconocer azúcares, específicamente manosas, azúcares que también presentan otras estructuras de la de la pared celular de *M. tuberculosis* como son el lipomanano o lipoarabinomanano y la lipoglicoproteína de 19kDa (todas presentan manosas), dichas estructuras se cree pueden ser responsables de la discriminación entre bacterias del complejo de micobacterias de crecimiento lento (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) y micobacterias de crecimiento rápido (*M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. avium* entre otras) por parte de las células dendríticas del sistema inmune (Pitarque *et al.*, 2005).

Respecto a los mecanismos de glicosilación, actualmente se sabe que *M. tuberculosis* presenta en su genoma un gen que codifica una proteína homóloga a la DPM, el gen *Rv2051c* o *ppm* (Gurcha *et al.*, 2002) y un gen que codifica una proteína homóloga a las PMTs de levadura, el gen *Rv1002c* (VanderVen *et al.*, 2005).

A pesar de su similitud, la DPM de *S. cerevisiae* y la Ppm de *M. tuberculosis* muestran importantes diferencias estructurales, ya que la Ppm de *M. tuberculosis* no tiene el dominio de anclaje a membrana en el extremo carboxilo-terminal como sí lo presenta la DPM de *S. cerevisiae*. Por otra parte, la Ppm de *M. tuberculosis* presenta dos dominios: el dominio Lnt, localizado en el extremo amino-terminal es una región rica en segmentos transmembranales y tiene actividad de aciltransferasa, cuya función es acilar lipoproteínas de *M. tuberculosis* (Tschumi *et al.*, 2009) y dominio Ppm, localizado en el extremo carboxilo, tiene actividad de poliprenol fosfato manosil sintasa. Los dominios Lnt y Ppm pueden ser separados físicamente, conservando el dominio localizado en extremo carboxilo su actividad catalítica (transferir manosas al poliprenol membranal), la cual ha sido demostrado en la glicosilación de lípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* como son el lipoarabinomanano, lipomanano y fosfatidilinositolmanósido (Gurcha *et al.*, 2002).

La fusión de estos dos dominios en una sola proteína es el resultado de un evento reciente de fusión génica pues en otras micobacterias y corinebacterias ambos dominios están como proteínas separadas codificadas por genes contiguos. Aún así, se sabe que los dominios Ppm y Lnt de *M. tuberculosis* interaccionan físicamente, resultado obtenido a través de un ensayos de doble híbrido realizados con la Ppm y Lnt de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, lo cual sugiere una estabilización del dominio catalítico en la membrana plasmática por parte del dominio Lnt (Baulard *et al.*, 2003).

La Pmt de *M. tuberculosis* al igual que su homólogo en *S. cerevisiae* (Willer, *et al.*, 2003) conserva los aminoácidos D55 y E56 que participan en la actividad catalítica de O-manosilación de proteínas. La localización de la Pmt en la membrana y el hecho de que varias proteínas glicosiladas de *M. tuberculosis* tienen un péptido señal de secreción vía sec, sugiere una

posible asociación entre estas dos vías (ver figura 2), dicha hipótesis ha sido reforzada por los resultados obtenidos al expresar y evaluar la glicosilación de la proteína FbpC de *M. tuberculosis* (no se glicosila en *M. tuberculosis*) fusionada a un péptido de la proteína Apa el cual sí se glicosila y a un péptido señal para secreción vía sec; el resultado que se obtuvo fue la glicosilación la proteína FbpC fusionada al péptido de la proteína Apa y al péptido señal via sec; para determinar la relación entre la secreción via sec y la glicosilación, se fusionó a la proteína FbpC unida al péptido de la Apa, un péptido de secreción de una vía alterna a sec de *M. tuberculosis*, y se observó que la proteína no se glicosila, lo cual hace pensar que existe una relación entre la secreción vía sec y la glicosilación de proteínas (VanderVen *et al.*, 2005).

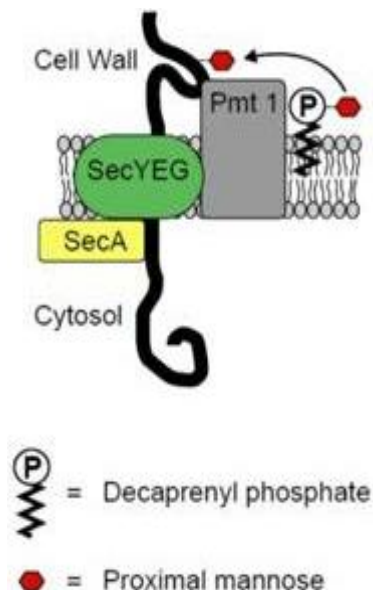


Figura 2: Mecanismo hipotético de glicosilación de proteínas en *M. tuberculosis* que propone una interacción entre la Pmt y Sec (Tomado de VanderVen *et al.*, 2005)

Respecto al sitio específico de glicosilación en las proteínas, no existe una secuencia consenso, actualmente se ha determinado una probable región de O-manosilación, basada en la espectrometría de masas del glicoproteoma de *M. tuberculosis* en la cual se demuestra que las serinas o treoninas glicosiladas están rodeadas de prolina y alaninas, y generalmente localizadas en el extremo carboxilo (Smith *et al.*, 2013).

Por último, estudios recientes (Mohiman *et al.*, 2012) realizados en *Corinebacterium glutamicum* han demostrado que las lipoglicoproteínas AmyE y LppX para que sean glicosiladas, es necesario que primero sean aciladas, actividad enzimática que lleva a cabo la enzima Lnt de *C. glutamicum*, la cual es homóloga a la Lnt de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor*, hasta el momento, no existen datos de la actividad de la enzima Lnt1 en *S. coelicolor*.

3. ANTECEDENTES

Investigación previa de nuestro grupo de investigación ha demostrado que la proteína Apa de *M. tuberculosis* se expresó en *S. lividans* desde su propio promotor así como desde el promotor fuerte e inducible P_{tipA} de *Streptomyces*. En este trabajo se observó que la proteína recombinante se secretó al medio de cultivo, se glicosiló y fue inmunodetectada por el anticuerpo monoclonal 6 A3 (específico para la proteína Apa de *M. tuberculosis*) con un doble marcaje de dos bandas de 45 y 47 kDa (Lara *et al.*, 2004). A diferencia de la proteína nativa, sólo la banda de 47 kDa reaccionó con concanavalina A y la electroforesis de doble dimensión reveló un solo punto isoeléctrico para la proteína recombinante. Las bandas de 45 y 47 kDa de la proteína recombinante se purificaron individualmente y se analizaron utilizando proteasas y secuenciación del extremo amino-terminal; los resultados del análisis revelaron que ambas bandas corresponden a la misma proteína, lo que sugiere que la diferencia en el peso molecular ha sido debido a diferencias en la glicosilación; para demostrar que hay diferencias en la glicosilación entre la banda de 45 y 47 kDa de la proteína recombinante Apa, se realizó una espectrometría de masas y se observaron diferencias en la glicosilación de los extremos amino y carboxilo de la Apa recombinante. Además, nuestro grupo ha demostrado que la Apa recombinante conserva sus propiedades antigénicas pues es reconocida por el suero de pacientes con tuberculosis (Lara *et al.*, 2004) lo que sugiere que *S. lividans* posee un sistema de glicosilación de proteínas similar al de *M. tuberculosis* razón por la cual lo convierte en un modelo para el estudio de los mecanismos de glicosilación de proteínas de *M. tuberculosis*.

4. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios en *M. tuberculosis* han demostrado que varias de las proteínas antigénicas están glicosiladas y aciladas.

S. coelicolor comparte un sistema de glicosilación (genes *ppm* y *pmt*) y acilación (*Int*) de proteínas homólogos a los sistemas de *M. tuberculosis*; sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos de glicosilación y acilación de proteínas en *M. tuberculosis*, en parte debido a las dificultades técnicas para trabajar con dicha bacteria, además del lento crecimiento del microorganismo y las estrictas condiciones de bioseguridad que se requieren para su cultivo.

S. coelicolor es una excelente opción para realizar estudios fisiológicos relacionados con mecanismos de glicosilación y acilación de proteínas pues se ha demostrado su capacidad de secretar y glicosilar proteínas, es una bacteria de vida libre no patógena y se han desarrollado varias técnicas de biología molecular para manipularla genéticamente.

5. HIPÓTESIS

El sistema de glicosilación de proteínas de *M. tuberculosis* conformado por las enzimas Ppm, Lnt y Pmt es funcional en *S. coelicolor*, lo cual permitirá generar una cepa de *S. coelicolor* productora de proteínas recombinantes glicosiladas con el sistema de glicosilación de *M. tuberculosis*.

6. OBJETIVOS

1.-Obtener cepas de *S. coelicolor* con mutaciones nulas en los genes *sco1423* (codifica para Ppm), *sco1014* (codifica para Lnt) y *sco3154* (codifica para Pmt) y evaluar el efecto de las mutaciones en la glicosilación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* y del receptor del fago Φ C31 de *S. coelicolor*.

2.-Clonar los genes homólogos de *M. tuberculosis* *Rv2051c* (codifica para Lnt en extremo amino y Ppm en extremo carboxilo) y *Rv1002c* (codifica para Pmt) y expresarlos en *S. coelicolor* para evaluar el restablecimiento de la glicosilación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* y el receptor del fago Φ C31 en *S. coelicolor*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1 Condiciones de crecimiento bacteriano.

E. coli se creció en medio YT2X a 37°C (Sambrook y Russell, 2001). La obtención del micelio de *S. coelicolor*, las preparaciones de esporas, las transformaciones con polietilenglicol, conjugaciones y la propagación de fagos se realizó en base a Kieser *et al*, 2000. Los ensayos de expresión de proteínas se realizaron creciendo a *S. coelicolor* en medio LB con sacarosa al 34%, la inducción de la expresión de los genes que codifican para las diferentes proteínas expresadas en *S. coelicolor* se realizó entre las 12 y 16 horas de crecimiento con 5 µg/mL de tioestrepton.

7.1.2 Obtención de mutantes nulas en los genes *sco3154*, *sco1423* y *sco1014* en *S. coelicolor*.

Las mutantes nulas se obtuvieron en base al protocolo desarrollado por Datsenko y Wanner (2000) sobre los cósmidos respectivos que llevan clonada la región correspondiente para cada gen (Redenbach *et al.*, 1996) seguido por la recombinación de las mutaciones en el cromosoma tal como ha sido descrito por Gust *et al* (2004). Todas las mutantes nulas se verificaron por PCR para confirmar el remplazo correcto del gen con una secuencia de 81 pares de bases llamada secuencia cicatriz. Los cósmidos que se utilizaron en la generación de mutantes nulas fueron St6D7A (para gen *sco1423*, *ppm*), StE87 (para gen *sco3154*, *pmt*) y 2StG2 (para gen *sco1014*, *Int1*). La lista de oligos utilizados en el protocolo de mutagénesis nulas está reportada en la tabla 4.

Las construcciones y los procesos de purificación de ADN han sido en base a Sambrook y Russell (2001). La amplificación de los genes por PCR se llevo a cabo utilizando la enzima ADN polimerasa PfuUltraAD (*Agilent Technologies*) y los protocolos de mutagenesis sitio dirigida utilizando el protocolo *Quick Change* (*Agilent Technologies*).

7.1.3 Clonación del gen *Rv1860* que codifica para la proteína Apa en pRT802.

La construcción *Rv1860*-pIJ6021 (Lara *et al.*, 2004) se digirió con *SacI* y *SstI* para sacar el fragmento que codifica para la proteína Apa y el promotor de P_{tipA} y se clonó en sitios romos en *EcoRV* de pRT802; el gen *tsr* se digirió con *BclI* del pIJ486 y se clonó en el sitio de *BamHI* del pRT802.

7.1.4 Clonación y mutagénesis del gen *Rv2051* (*ppm*) de *M. tuberculosis* en pIJ6902.

El gen *Rv2051c* se amplificó del ADN cromosomal de *M. tuberculosis* H37Rv con los oligos *Rv2051FOR* y *Rv2051REV* bajo las siguientes condiciones: 95°C / 4 min---29 ciclos de: 95°C / 1 min---55°C / 1 min---72°C / 8 min --- extensión final de 72°C / 5 min y se clonó en pUCBM21 en el sitio *EcoRV*. Mediante el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida *Quick-change* de STRATAGENE se eliminó un sitio interno de *NdeI* usando los oligos *mutNdeI**Rv2051FOR* y *mutNdeI**Rv2051REV* y se insertó el sitio *NdeI* al inicio del gen usando los oligos *mutagRv2051FOR* y *mutagRv2051REV*. Los plásmidos resultantes se verificaron por secuenciación. Posteriormente, se clonó en el pIJ6902 en los sitios *NdeI*-*EcoRI*, donde la expresión del gen está bajo el control del promotor de P_{tipA} .

La separación del dominio catalítico (D2) de *Rv2051c* se realizó mediante la inserción del sitio NdeI al inicio del fragmento del gen que codifica para el dominio D2 utilizando el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida *Quick-change* de STRATAGENE y los oligos MutagD2Rv2051FOR y MutagD2Rv2051REV. Posteriormente se clonó en el plJ6902 en los NdeI-EcoRI donde la expresión está bajo el control del promotor P_{tipA}.

7.1.5 Clonación del gen *sco1423 (ppm)* de *S. coelicolor* en pSET152.

El gen *sco1423* se amplificó de ADN cromosomal de *S. coelicolor* por PCR usando los oligos SCO1423BFOR y SCO1423BREV y las siguientes condiciones: 95°C / 4 min---29 ciclos de: 95°C / 1 min---55°C / 1 min---72°C / 3 min ---extensión final de 72°C / 5 min. Se clonó en el pSET152 en el sitio EcoRV.

7.1.6 Clonación y mutagénesis del gen *Rv1002c (pmt)* de *M. tuberculosis* en plJ6902.

El gen *Rv1002c* se amplificó del ADN cromosomal de *M. tuberculosis* H37Rv usando los oligos *Rv1002FOR* y *Rv1002REV* y se clonó en el pSET152 en los sitios XbaI- BamHI. En base al protocolo de mutagénesis sitio-dirigida *Quick-change* de STRATAGENE se cambió el codón TTA::CTG con los oligos mutTTARv1002FOR y mutTTARv1002REV y se insertó el sitio NdeI al inicio del gen usando los oligos mutagRv1002FOR y mutagRv1002REV. El plásmido resultante se verificó por secuenciación. Posteriormente, se clonó en el plJ6902 en los sitios NdeI-BamHI, donde la expresión del gen está bajo el control del promotor P_{tipA} de *Streptomyces*.

7.1.7 Clonación del gen *sco3154* (*pmt*) de *S. coelicolor* en pIJ6902.

El gen *sco3154* se amplificó de ADN cromosomal de *S. coelicolor* por PCR usando los oligos SCO3154UP y SCO3154DOWN bajo las siguientes condiciones: 95°C- 4 min, 30 ciclos de 95°C-1'→55°C-1'→72°C-2'30''→Extensión final de 72°C-5' y se clonó en pSET152.

7.1.8 Construcción de PMT químeras.

Para construir la quimera 1 se amplificó un fragmento de 173 pb que corresponde a los primeros 55 aminoácidos de la Pmt de *S. coelicolor* (*sco3154*) usando los oligos QUIM1FORXbaI NdeI y QUIM1REVAsp y se subclonó en el pUCBM21 en el sitio XbaI y Asp718 para posteriormente clonarlo en fase con la Pmt de *M. tuberculosis* (*Rv1002c*) en los sitios NdeI-Asp718. Una vez obtenida la fusión se clonó en pIJ6902 en los sitios NdeI-BamHI.

La quimera 2 se realizó fusionando dos fragmentos de PCR. El primer fragmento corresponde al primer dominio transmembrana y al loop extracelular que tiene el sitio catalítico de la Pmt de *S. coelicolor* (*sco3154*), para realizar el PCR se utilizaron los oligos QUIM1FORXbaI NdeI y QUIM2INTEREV, el segundo fragmento corresponde al gen completo de la Pmt de *M. tuberculosis* (*Rv1002c*) el cual se amplificó por PCR utilizando los oligos *Rv1002_FOR* y *Rv1002_REV*. Ambos fragmentos de PCR se purificaron y se realizó un tercer PCR utilizando los oligos QUIM1FORXbaI NdeI y QUIM2BamHIREV para hacer la fusión del fragmento que codifica para el primer dominio transmembrana y al loop extracelular que tiene el sitio catalítico de la Pmt de *S. coelicolor* y el resto de la Pmt de *M. tuberculosis* (*Rv1002c*). Posteriormente el producto de los dos fragmentos fusionados se subclonó en el pSET52 en los sitios XbaI-BamHI y se clonó en

el pIJ6902 en los sitios NdeI-BamHI para expresarlo en *Streptomyces*. La fusión se verificó por secuenciación.

7.1.9 Clonación de los genes utilizados en el ensayo de doble híbrido.

El gen *sco1014 (Int)* se amplificó usando los oligos DHSCO1014FOR y DHSCO1014REV y se clonó en el pKT25 en los sitios BamHI-PvuII; el gen *sco1423 (ppm)* se amplificó usando los oligos DHSCO1423FOR y DHSCO1423REV y se clonó en el pUT18 en los sitios PstI-BamHI. Como control, el fragmento del gen *Rv2051c* que codifica para el dominio transmembranal de Ppm de *M. tuberculosis* (Ppm-D1) se clonó en los sitios PstI-BamHI en el pKT25 y el fragmento que corresponde al dominio catalítico de Ppm de *M. tuberculosis* (Ppm-D2) se clonó en los sitios XbaI-BamHI en el pUT18. Las clonaciones se realizaron en fase con los dominios de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*.

7.1.10 Fusión del epítoto HA de la hemaglutinina del virus *Haemphilus influenza* en el extremo carboxilo de la Pmt de *M. tuberculosis* y Pmt de *S. coelicolor* para inmunodetección.

Mediante un PCR usando los oligos *sco3154HAFOR* y *sco3154HAREV* se realizó la fusión del epítoto HA (YPYDVPDYA, aminoácidos 98-106) al extremo carboxilo de la Pmt de *S. coelicolor*; se subclonó en pSET152 en los sitios HindIII-XbaI para después clonarlo en pIJ6902 en los sitios NdeI-XbaI. Para fusionar el epítoto de HA al extremo carboxilo de la Pmt de *M. tuberculosis* se hizo un PCR usando los oligos *Rv1002cHAFOR* y *Rv1002cHAREV*; se subclonó en pSET152 en los sitios XbaI-BamHI para después clonarlo en pIJ6902 en los sitios NdeI-BamHI. Los plásmidos resultantes fueron verificados por secuenciación.

7.2 Electroforesis desnaturizante e Inmunoréplicas

Para la detección de la proteína Apa en los sobrenadante de los cultivos de *S. coelicolor*, las proteínas se concentraron con metanol-cloroformo (Wessel y Flügge, 1984).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (p/v) y SDS 0.1% (p/v), posteriormente se realizó inmunotransferencia a membranas de PVDF (Millipore) (Towbin, 1979). Las membranas obtenidas de las inunorréplicas se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en TBS-Tween 20 (0.05% v/v) (consultar la composición de las soluciones en el anexo 3) para la detección de las proteínas con anticuerpos y TBS con BSA 1% (p/v) para la detección de carbohidratos con la lectina. La detección de la proteína Apa se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal MAb 6A3 1:1000 (Lara *et al*, 2004) y la detección de los carbohidratos unidos a la proteína se realizó utilizando la lectina concanavalina A (ConA)-peroxidasa (Sigma) 1:1000. La detección del epítotope HA se realizó utilizando el anticuerpo anti-HA-peroxidasa (Roche) 5 µg/mL. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-ratón inmunoglobulina G unido a peroxidasa 1:1000 (Sigma). La detección se realizó por quimioluminiscencia (*BM Chemiluminescence Western blotting kit*, Roche).

7.3 Obtención de la fracción membranal para ensayos de actividad enzimática *in vitro* de Ppm y Pmt

El micelio obtenido de los cultivos de *S. coelicolor* se lavó con un volumen de PBS 1X pH=7.4 tres veces y se resuspendió en 25 mL de Solución A

(consultar la composición de las soluciones en el anexo 3). Una vez resuspendido, el micelio se sonico con 25 pulsos de 20 segundos cada uno, enfriando dos minutos cada cinco pulsos. Una vez sonicado, el micelio se centrifugó a 8 000 x *g* durante 1 hora a 4°C, se colectó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 100,000 x *g* durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla obtenida (la cual corresponde a la membrana celular) se resuspendió en el mínimo volumen de Solución A.

7.4 Ensayo de transferencia de manosas al poliprenol localizado en las membranas de *S. coelicolor*

Como se describí con anterioridad (ver protocolo 7.3) se obtuvieron 30 µg de proteínas membranales se incubaron con 62.5 µM ATP, 10 µM MgCl₂ y 2.4 µM GDP-[¹⁴C]Man (262 mCi/mmol, PerkinElmer Life) en un volumen final de 50 µl (ajustar con Solución A) y se incubó a 37°C por 30 minutos. La reacción se detuvo agregando CHCl₃, CH₃OH, 0.8 M NaOH (10:10: 3 v/v) (4 ml /50 µl de reacción) seguido de una incubación a 50 °C por 20 minutos. Cumplido el tiempo, se agregaron 1.75 ml of CHCl₃ and 0.75 ml de agua. La fase orgánica se lavó tres veces con 2 ml of CHCl₃, CH₃OH, H₂O (3:47: 48 v/v) y la fracción orgánica obtenida se secó con aire y se resuspendió en 200 µl de CHCl₃CHOH (2 :1 v/v) para posteriormente correr en cromatografía de capa fina (placas de aluminio y silica gel 60 F₂₅₄, E-Merck, D-6100 Darmstadt) con una fase móvil de CHCl₃, CH₃OH, NH₄OH, H₂O (65: 25: 0.4 : 3.6 v/v). La autorradiografía se obtuvo por la exposición del cromatograma a placas fotográficas (Kodak X-Omat K XK-1) durante 5 días a -70°C.

7.5 Ensayo de actividad *in vitro* de la enzima Pmt en membranas de *Streptomyces coelicolor*

La reacción *in vitro* fue llevada a cabo por la incorporación de [¹⁴C] Manosa al péptido sintético A3.

Como se describí con anterioridad (ver protocolo 7.3) 30 µg de proteínas membranales se incubaron con 1.9 nM GDP-[¹⁴C] Man (262 mCi/mmol, PerkinElmer Life), 1 µM ATP, 10 µM MgCl₂, 50 µg de proteína membranal, 1mM DTT y 0.5 mg del péptido sintético A3 de la proteína Apa de *M. tuberculosis* A3 ajustando a un volumen final de 160 µl (ver anexo 3) , la reacción se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, la enzima se inactivó calentado 2 min a 85 °C y se centrifugó a 13 000 x g media hora para recuperar el sobrenadante. El sobrenadante se cargó en una columna de exclusión molecular Econo-Column Bio-Rad (23 cm X 1.5 cm) empacada con Bio-Gel P-2 fine (Bio-Rad). La elución se realizó con agua a un flujo de 0.1 mL/min, se colectaron 100 fracciones de 0.5 mL, las cuales se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo Ultima-Gold PerkinElmer. La radioactividad se cuantificó en el contador de centelleo Beckman Coulter LS6500.

La confirmación de la presencia o ausencia del péptido marcado radioactivamente en las fracciones correspondientes a los picos obtenidos se realizó por HPLC LC-10ATVP Shimatzu usando una columna C18 Bondapak de 10 µm, 4.6 mm X 30 cm, corrida isocrática acetonitrilo 15% y agua 85% v/v, con un flujo de 1mL/min, la lectura de las muestras se realizó a una longitud de onda λ 220 nm.

7.6 Ensayo de localización de la enzima Pmt en la membrana celular de *S. coelicolor*

El crecimiento de *S. coelicolor* se realizó como se ha reportado anteriormente (ver sección 7.1.1), el micelio se colecto y se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min a 4°C para lavarse cuatro veces con 20 mM Tris-HCl pH=8 a una temperatura de 4°. El micelo lavado se resuspendió en 25 mL del solución de lisis [20 mM Tris-HCl pH 8,4 mM MgCl₂, 4 mM DTT, tableta de inhibidores

de proteasas en base al volumen (Roche)] y se sonicó (25 ciclos de 20 s a 4°C) con intervalos de enfriamiento de 2 min. El desecho celular se eliminó por centrifugación 8 000 x *g* durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante se colectó para ultracentrifugar a 100 000 x *g* durante 1 hora a 4°C y así obtener el citoplasma el cual corresponde al sobrenadante y una pastilla la cual corresponde a la membrana celular. La membrana obtenida se lavó con NaCl 250 mM de para remover proteínas no específicas asociadas a membrana. Después del lavado se ultracentrifugó a 100 000 x *g* durante 30 min a 4°C para recuperar la pastilla la cual corresponde a la membrana celular.

7.7 Ensayo de actividad de β -galactosidasa (interacción entre ppmD1 y ppmD2 de *M. tuberculosis* y sus homólogos en *S. coelicolor*)

El sistema de doble híbrido utilizado en este ensayo ha sido el reportado por Karimova *et al* (1998) y Klepp *et al* (2009) el cual utiliza los plásmidos pKT25 y pUT18 los cuales tienen fusionados dos dominios de interacción de la adenilato ciclasa (codificada por el gen *cya*) de *Bordetella pertussis*. Los ensayos de interacción se cuantificaron en base a la actividad de la enzima β -galactosidasa de acuerdo al protocolo de Miller, 1972.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 La actividad de la enzima Ppm es necesaria para la glicosilación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*.

En trabajos previos (Cowlshaw y Smith, 2002) se ha reportado la participación del producto del gen *sco1423*, el cual corresponde a la enzima Ppm (poliprenol-fosfato-manosa sintasa) en el sistema de glicosilación de proteínas de *S. coelicolor*, la manera de demostrarlo fue utilizando al receptor del fago Φ C31 de *S. coelicolor* el cual está glicosilado, de tal forma que si el receptor tiene carbohidratos unidos, el fago Φ C31 lo reconocerá y podrá infectar a *S. coelicolor* y lisar a las células, lo cual se observa con la formación de placas; por lo tanto, si el receptor del fago no está glicosilado, el fago Φ C31 no lo reconocerá y no podrá infectar y lisar a *S. coelicolor*, por lo tanto, no habrá formación de placas. El receptor del fago ha sido utilizado en los ensayos de este trabajo como sustrato de glicosilación para observar la actividad de las enzimas que participan en la vía de glicosilación.

Las mutantes nulas fueron generadas utilizando el protocolo de mutagénesis PCR-targeting el cual consiste en intercambiar por recombinación homóloga el gen de interés por un cassette de resistencia a un antibiótico teniendo la opción posteriormente de eliminar el cassette y así obtener una mutante nula sin resistencia al antibiótico lo cual nos permite utilizar una gran variedad de plásmidos para los ensayos de expresión. De esta manera, el gen *sco1423* (*ppm*) fue eliminado en *S. coelicolor* J1928 y a dicha cepa se le nombró como IB31. La eliminación del gen *sco1423* de *S. coelicolor* J1928 se verificó por PCR, como se observa en la figura 1.

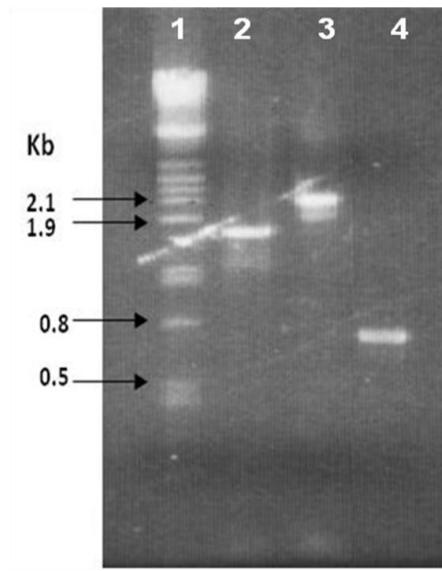


Figura 1. Verificación de la eliminación del gen *ppm* (*sco1423*) por PCR. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular, el 2 al gen *sco1423* amplificado de la cepa silvestre (1.5 kilobases), el carril 3 al gen *sco1423* eliminado y substituido por el cassette de apramicina (2 kilobases) y el carril 4 al gen *sco1423* eliminado y substituido por los sitios FRT (cicatriz) (0.7 kilobases).Kb significa kilobases.

Una vez verificada la eliminación del gen *sco1423*, se realizaron ensayos de infección con el fago Φ C31 y como se observa en la figura 2 imagen 1, el fago Φ C31 reconoce a su receptor glicosilado, por lo tanto pude lisar a las células lo que se observa con la formación de placas, evento que no ocurre al eliminar el gen *sco1423* (figura 2, imagen 2) lo cual confirmó que Ppm^{Sco} es requerida para la infección del fago Φ C31.

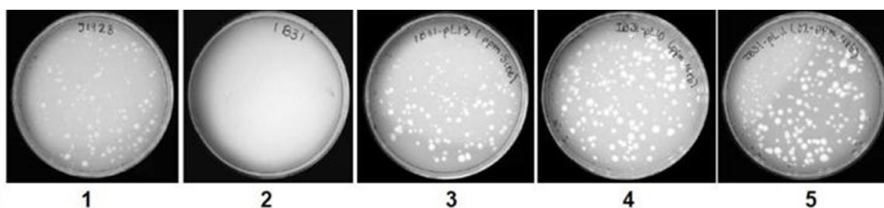


Figura 2 Ensayo del restablecimiento de la glicosilación con la enzima Ppm de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor* Δppm (IB31). Formación de placas en *S. coelicolor* (1), IB31 (Δppm) (2), IB31 complementada con pL13 (Ppm de *S. coelicolor*) (3), IB31 complementada con pBL10 (dominios D1 (Lnt) y D2 (Ppm) de la enzima Ppm de *M. tuberculosis*) (4) e IB31 complementada con pBL11 (dominio D2 de la enzima Ppm de *M. tuberculosis*) (5). Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de placas del fago $\Phi C31$ en todas las cepas.

Para determinar si Ppm^{SCO} es requerida para la glicosilación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*, se clonó el gen *Rv1860* en el vector integrativo pRT802 donde su expresión está bajo el promotor *P_{tipA}* (pBL1, tabla 5) y el plásmido resultante se introdujo a la cepa silvestre (J1928) y a la cepa mutante Δppm (IB31). La proteína Apa de *M. tuberculosis* se expresa y se secreta al medio de cultivo en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004), por lo tanto, la proteína Apa fue colectada del sobrenadante del medio de cultivo de *S. coelicolor* (*S. lividans* y *S. coelicolor* son bacterias muy cercanas genéticamente), se precipitó por metanol-cloroformo y se detectó por inmunorreplicas tipo *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal 6A3 que reconoce a la proteína Apa como se observa en la figura 3 a carril 1; para detectar la presencia de carbohidratos en la proteína se utilizó la lectina concanavalina A como se observa en figura 3 b carril 1, lo cual nos permite concluir que *S. coelicolor* fue capaz de expresar, secretar y glicosilar a la proteína Apa como ya se había demostrado en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004).

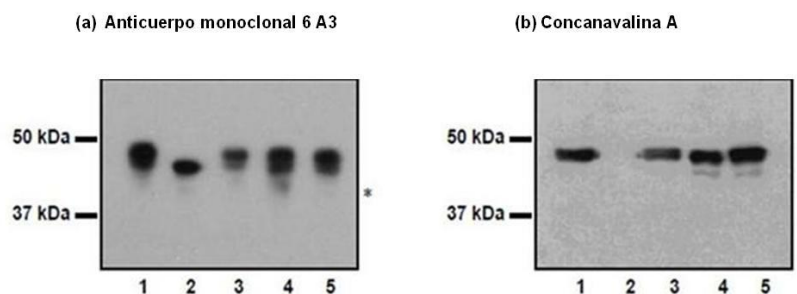


Figura 3. Efecto de la eliminación del gen *ppm* (*sco1423*) que codifica para Ppm^{Sco} y complementación con su homólogo de *M. tuberculosis*.(a) Inmunodetección de Apa de *M. tuberculosis* usando MAb 6 A3 y (b) detección de la glicosilación usando concanavalina A en *S. coelicolor* (carril 1), IB31(carril 2), IB31 que expresa la enzima Ppm de *S. coelicolor* (carril 3), IB31 que expresa los dominios D1 (Lnt) y D2 (Ppm) de la enzima Ppm de *M. tuberculosis* (carril 4) e IB31 que expresa el dominio D2 (Ppm) de la enzima Ppm de *M. tuberculosis* (carril 5).

En contraste con *S. lividans*, la proteína Apa secretada por *S. coelicolor* fue blanco de degradación, lo cual fue revelado por la presencia de bandas que migran con una masa molecular menor a la de la proteína completa (ver figura 3 y figura 13 marcas con asterisco), las cuales no se observaron al expresarla en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004), esto es consistente con la observación por otros grupos de que *S. coelicolor* es más proteolítico que *S. lividans* (Kieser *et al.*, 2000; Jayapal *et al.*, 2007).

Al analizar los sobrenadantes de la mutante *ppm* IB31, se observó que la proteína Apa se expresó y se secretó, como lo demuestra la detección con el anticuerpo monoclonal 6A3 (figura 3 a carril 2) pero no se encontraba glicosilada y migraba con una masa molecular menor respecto a la proteína Apa expresada en la cepa silvestre (figura 3 b carril 2). Estos resultados sugieren que la enzima Ppm^{Sco} es esencial para la glicosilación de la proteína Apa en *S. coelicolor*.

8.2 Restablecimiento de la actividad de Ppm en *S. coelicolor* Δ *ppm* por la enzima Ppm de *M. tuberculosis*.

Para determinar si la actividad de la enzima Ppm de *S. coelicolor* IB31 (Δppm) puede ser restablecida por la enzima Ppm de *M. tuberculosis*, el gen *Rv2051c* fue amplificado a partir de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y se clonó en pIJ6902 donde su expresión está bajo el control del promotor P_{tipA} (plásmido pBL10, tabla 1); el gen *ppm* de *S. coelicolor* (*sco1423*) más su región promotora se amplificaron de ADN de *S. coelicolor* y se clonó en el vector pSET152 como control control positivo del restablecimiento de la actividad enzimática (plásmido pBL13, tabla 5). Al realizar el ensayo de glicosilación utilizando al receptor del fago $\Phi C31$ como sustrato de glicosilación en la cepa de *S. coelicolor* Δppm IB31 complementada con pBL10 y pBL13, los cuales expresan los genes de Ppm^{Mtu} y Ppm^{SCO} respectivamente, se observó que el fago reconoce al receptor glicosilado, por lo que infectó y liso las células lo que se observa en la formación de placas (figura 2 imagenes 3 y 4), por lo tanto podemos concluir que la enzima Ppm de *M. tuberculosis* es funcional en la vía de glicosilación de *S. coelicolor*. Para demostrar que la enzima Ppm de *M. tuberculosis* participa en la glicosilación de la proteína Apa, las cepas IB31 complementada con pBL10 (Ppm^{Mtu}) e IB31 complementada con pBL13 (Ppm^{SCO}) fueron transformadas por protoplastos con el plásmido pBL1 (construcción con el gen *Rv1860* que codifica para la proteína Apa) y posteriormente se realizaron cultivos y ensayos de expresión de las enzimas Ppm de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* además de la proteína Apa de *M. tuberculosis* la cual fue colectada de los sobrenadantes del medio de cultivo. La proteína Apa se precipitó con metanol-cloroformo y se realizaron inmunorreplicas por Western Blot donde se observó que en ambas cepas la proteína Apa se expresó (ya que pudo ser detectada con anticuerpo monoclonal) (figura 3 a carriles 3 y 4) y se restableció la glicosilación, lo cual fue demostrado por el reconocimiento con concanavalina A (figura 3 b carriles 3 y 4), por lo tanto, nos permite concluir

que la enzima Ppm de *M. tuberculosis* participa en la vía de glicosilación de la proteína Apa de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*.

Para demostrar la actividad *in vitro* de Ppm^{Mtu} en *S. coelicolor*, se realizaron ensayos de marcaje del lípido de membrana poliprenol fosfato de *S. coelicolor* con manosa marcada con carbono 14.

Estudios previos han demostrado que *S. coelicolor* posee un poliprenol fosfato de 45 carbonos (Wehmeier *et al.*, 2009), por lo tanto se realizaron extractos membranales de *S. coelicolor* silvestre y se incubaron con GDP-manosa marcada con carbono 14 para determinar la actividad de la enzima Ppm la cual consiste en transferir manosa unida a GDP al poliprenol, el resultado obtenido se muestra en la figura 4 carril 1 de la cromatografía en capa fina donde se observa una banda la cual corresponde al poliprenol manosilado de *S. coelicolor* silvestre, mientras que en el ensayo de actividad catalítica realizado con el extracto membranal obtenido de la cepa IB31 (*S. coelicolor* Δppm) no se observó marcaje (figura 4 carril 2). La restauración de la actividad catalítica con la Ppm^{SCO} y Ppm^{Mtu} en la cepa IB31 (*S. coelicolor* Δppm) fue confirmada a través del ensayo *in vitro* pues se observó marcaje del poliprenol fosfato en las membranas de la cepa mutante complementada con pBL13 (Ppm^{SCO}) y pBL10 (Ppm^{Mtu}) (ver figura 4 carriles 3 y 4) confirmando que la enzima Ppm^{Mtu} es funcional en *S. coelicolor*.

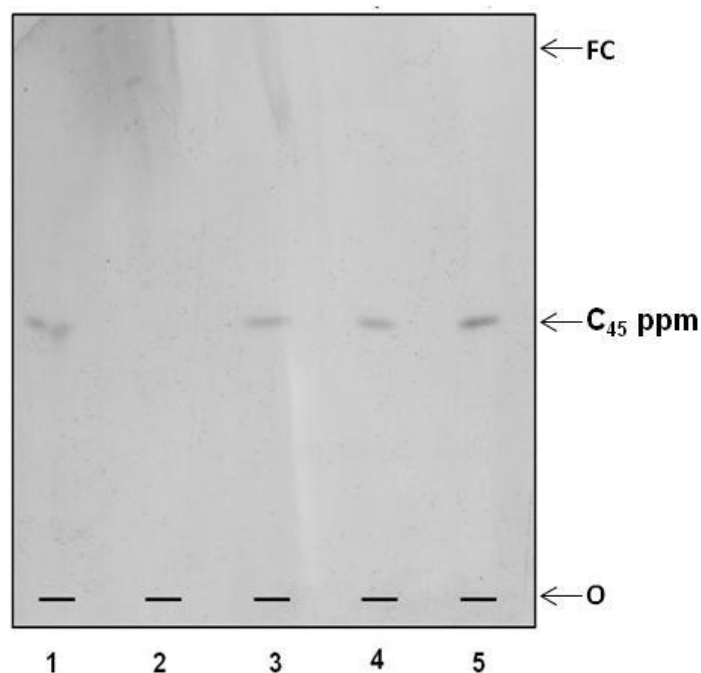


Figura 4. Marcaje *in vitro* del poliprenol fosfato de membrana con GDP-[¹⁴C]-Manosa. Cromatografía de capa fina de los productos marcados con GDP-[¹⁴C]-Manosa de la fracción membranal de: *S. coelicolor* silvestre (carril 1) donde se observa el poliprenol manosilado, IB31 (Δppm) (carril 2), IB31 complementada con pBL13 (Ppm^{Sc^o}) (carril 3), IB31 complementada con pBL10 (Ppm^{Mtu}) (carril 4) e IB31 complementada con pBL11 (D2-Ppm^{Mtu}) (carril 5). O significa Origen de corrida, ppm poliprenol manosilado y F frente de corrida.

Ppm^{Mtu} es una proteína compuesta por dos dominios distintos. El dominio amino terminal D1 (Met1-Tyr593) es un dominio hidrofóbico con actividad de aciltransferasa de lipoproteínas (Lnt), y el dominio carboxilo terminal D2 (Met594-Glu874) tiene la actividad catalítica de Ppm (Gurcha *et al.*, 2002; Tschumi *et al.*, 2009). Por lo tanto, decidimos analizar si el dominio D2 de la Ppm de *M. tuberculosis* es funcional en ausencia del dominio D1. Para demostrarlo, el dominio D2 fue clonado en el vector pIJ6902 donde su expresión está bajo el promotor P_{tipA} (pBL11) y fue introducido a la mutante de *S. coelicolor* Δppm IB31. Las figuras 2 imagen 5 y la tabla 1 demuestran que la expresión del dominio D2 de Ppm^{Mtu} aislado es suficiente para complementar la mutación de *S. coelicolor* Δppm (IB31) tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que se observó la restauración de la formación de placas del fago

Φ C31 (figura 2 placa 5), la reactividad de la proteína Apa con la ConA (figura 3 **b** carril 5) y el marcaje *in vitro* del poliprenol fosfato (figura 4 carril 5).

Cepa	Plásmido	pfu/ml ^a	eop ^b
J1928 (cepa silvestre)	Ninguno	3.96x10 ⁹	1.00
IB31 (Δppm)	Ninguno	-	-
IB31 (Δppm)	pBL13 (Ppm ^{SCO})	3.32x10 ⁹	0.84
IB31 (Δppm)	pBL10 (Ppm ^{Mtu})	4.00x10 ⁹	1.01
IB31 (Δppm)	pBL11 (D2-Ppm ^{Mtu})	3.90x10 ⁹	0.98
IB25(Δpmt)	Ninguno	-	-
IB25(Δpmt)	pBL12 (Pmt ^{SCO})	3.04x10 ⁹	0.77
IB25(Δpmt)	pBL9 (Pmt ^{Mtu})	-	-
IB65 ($\Delta lnt1$)	Ninguno	2.60x10 ⁹	0.66
IB67 ($\Delta ppm \Delta lnt1$)	Ninguno	-	-
IB67 ($\Delta ppm \Delta lnt1$)	pBL13 (Ppm ^{SCO})	3.40x10 ⁹	0.86
IB67 ($\Delta ppm \Delta lnt1$)	pBL11 (D2-Ppm ^{Mtu})	2.60x10 ⁹	0.66

Tabla 1. Eficiencia de la formación de placas con el fago Φ C31 en la cepa silvestre y mutantes. ^a El mismo lisado de fagos fue usado en todas las cepas. ^b Eficiencia en la formación de placas relativas a la cepa silvestre J1928.

8.3 El homólogo de la enzima Lnt de *M. tuberculosis* no es esencial para la glicosilación de la proteína Apa en *S. coelicolor*.

En micobacterias y corinebacterias, Lnt y Ppm son dominios funcionales de la misma proteína (como en *M. tuberculosis*) o de proteínas separadas codificadas por genes contiguos acoplados traduccionalmente (Gurcha *et al.*, 2002) y como ya se ha demostrado en este trabajo, Ppm de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* participa en la vía de glicosilación de proteínas mientras que la actividad de Lnt en la vía de glicosilación de proteínas no ha sido estudiada previamente en *S. coelicolor*. Recientemente ha sido

demostrada en *Streptomyces scabies* la presencia de dos genes que codifican proteínas homólogas a la enzima Lnt de *M. tuberculosis*. La enzima nombrada como Lnt1 comparte un 44% de identidad con la enzima Lnt de *M. tuberculosis* y tiene actividad de aciltransferasa, mientras que la actividad de la enzima nombrada como Lnt2, la cual comparte un 26% de identidad con la enzima Lnt de *M. tuberculosis*, es poco clara (Widdick *et al.*, 2011). El genoma de *S. coelicolor* muestra que, al igual que en *S. scabies*, existen dos genes que codifican para proteínas homólogas a la Lnt de *M. tuberculosis*. Para evaluar la participación de la enzima Lnt1 de *S. coelicolor* en la vía de glicosilación de proteínas, mediante el protocolo de PCR-tageting que se menciona con anterioridad se obtuvo la mutante nula IB65 en el gen *Int1* (*sco1014*) de *S. coelicolor* J1928, la cual se verificó por PCR (figura 5 (a)) y secuenciación (figura 5 (b)).

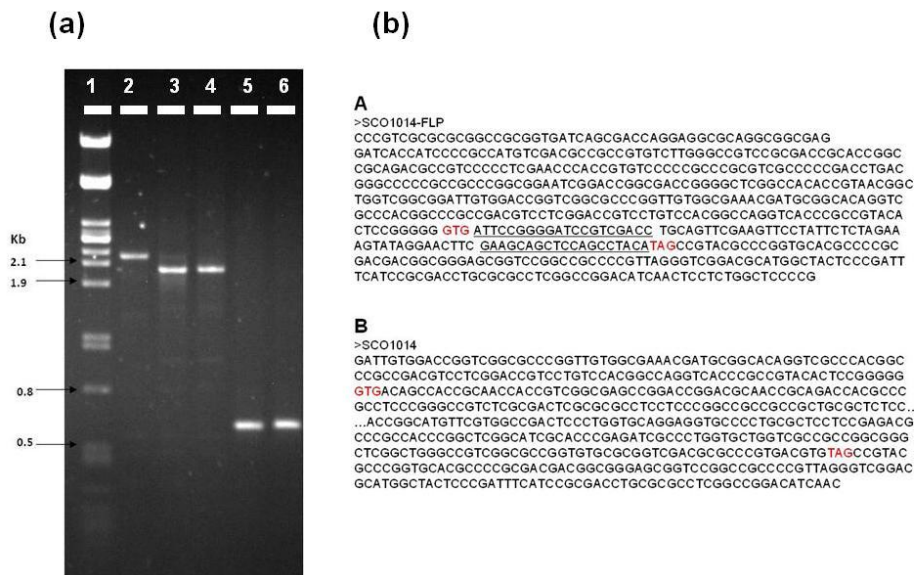


Figura 5. Verificación de la mutación del gen *sco1014* de *S. coelicolor* por PCR (a) y por secuenciación (b). La imagen (a) corresponde al PCR. El carril 1 es el marcador de masa molecular, el carril 2 al gen *sco1014* amplificado de la cepa silvestre (2.2 kilobases), los carriles 3 y 4 al gen *sco1014* mutado y substituido por el cassette de apramicina (1.9 kilobases) y los carriles 5 y 6 al gen *sco1014* mutado y substituido por los sitios FRT (cicatriz) (0.59 kilobases) La imagen (b) representa el análisis de la secuencia. La secuencia A es la obtenida de la reacción de la mutante, en rojo están el codón de inicio (GTG) y el de término (TGA) y subrayados están los sitios FRT del cassette de apramicina. La secuencia B corresponde a una parte de la secuencia del gen *sco1014* flanqueado por 120 pb obtenidas

del genoma de *Streptomyces coelicolor* <http://strepdb.streptomyces.org.uk> en rojo están el codón de inicio (GTG) y el de término (TGA). Kb significa kilobases.

Una vez verificada la eliminación del gen *Int1*, se evaluó su participación en la vía de glicosilación de proteínas de *S. coelicolor* utilizando al receptor fago Φ C31 como sustrato de glicosilación. En la figura 6 y tabla 1 se muestra que el fago Φ C31 formó placas en *S. coelicolor Int1* (IB65); además, la proteína Apa obtenida del sobrenadante del cultivo de la mutante *Int1* de *S. coelicolor* fue reconocida por la concanavalina A lo que demuestra que la proteína está glicosilada (figura 6), por lo tanto podemos concluir que el producto del gen *Int1* es dispensable en la vía de glicosilación de proteínas en *S. coelicolor*.

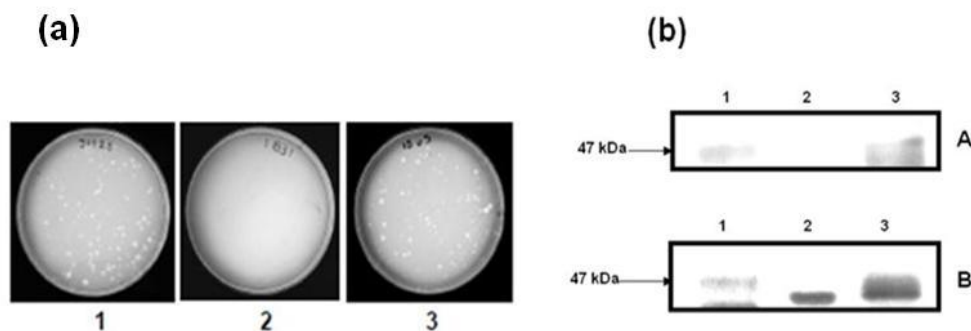


Figura 6. Efecto de la eliminación del gen *Int1* (*sco1014*) en la vía de glicosilación de proteínas (a) Formación de placas en *S. coelicolor* J1928 (imagen 1), IB31 ($\Delta ppm1$) (imagen 2) como control negativo y *S. coelicolor* mutado en *Int1* IB65 ($\Delta sco1014$) (imagen 3). Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de placas del fago Φ C31 en todas las cepas. **(b)**. Inmunodetección de la proteína Apa usando el anticuerpo monoclonal 6 A3 **(A)** y detección de la glicosilación de la proteína Apa con la lectina Concanavalina A **(B)** en *S. coelicolor* (carril 1), IB31 (carril 2) e IB65 (ΔInt) (carril 3).

Trabajos previos han demostrado que la actividad Lnt del dominio D1 de Ppm^{Mtu} ha sido requerida para la actividad total de la enzima Ppm y se especuló que su función podría ser de dominio de anclaje a la membrana para la enzima Ppm^{Mtu} (D2) (Gurcha *et al.*, 2002). Por lo tanto, decidimos probar la funcionalidad del dominio D2 de la enzima Ppm^{Mtu} en ausencia de

la enzima Ppm^{Sco} y de la enzima Lnt1 en *S. coelicolor*, para lo cual mediante el protocolo de mutagenesis PCR-targeting se obtuvo una doble mutante en los genes *ppm* y *lnt1* de *S. coelicolor* (IB67) la cual fue verificada por PCR (figura 7).

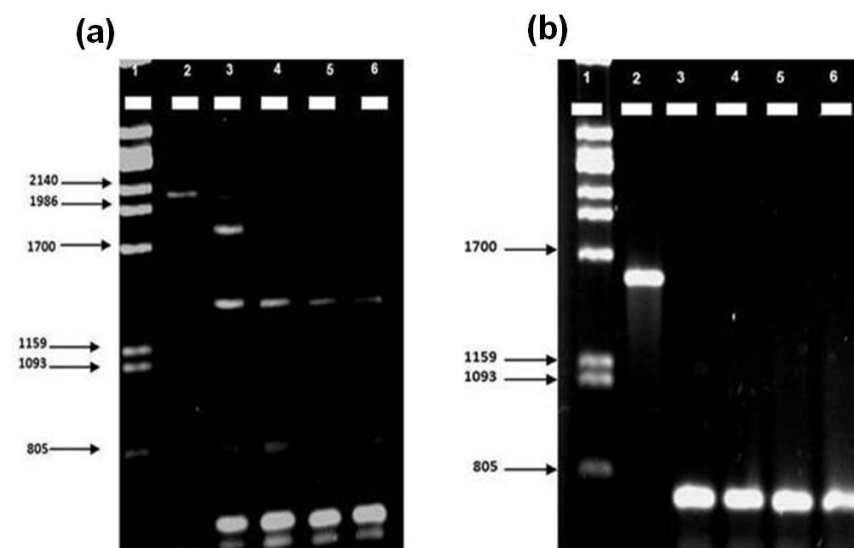


Figura 7: Verificación de la doble mutante: gen *sco1014* (*lnt1*) y gen *sco1423* (*ppm*). La imagen (a) corresponde a la verificación de la mutación del gen *sco1014* de *S. coelicolor* por PCR. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular, el 2 al gen *sco1014* amplificado de la cepa silvestre (2.2 kilobases), los carriles 3 al 6 al gen *sco1014* mutado y sustituido por los sitios FRT (cicatriz) (0.59 kilobases). La imagen (b) corresponde a la verificación de la mutación del gen *sco1423* de *S. coelicolor* por PCR. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular, el 2 al gen *sco1423* amplificado de la cepa silvestre (1.5 kilobases), los carriles 3 al 6 al gen *sco1423* mutado y sustituido por los sitios FRT (cicatriz) (0.7 kilobases).

El gen que codifica para la enzima Ppm^{Sco} clonado en el vector pSET152 (plásmido pBL13) al igual que el gen que codifica sólo para el D2 de la enzima Ppm^{Mtu} clonado en el pIJ6902 (plásmido pBL11) fueron introducidos en la doble mutante Δppm y $\Delta lnt1$ (IB67) y analizados en base a la capacidad de restablecer la infección del fago $\Phi C31$ a través de la glicosilación de su receptor.

Los resultados se muestran en la figura 8 y en la tabla 1 donde, como se esperaba, el fago Φ C31 fue incapaz de formar placas en la doble mutante $\Delta ppm \Delta pmt$ de *S. coelicolor* IB67 (figura 8, imagen 1), mientras que la formación de placas en la doble mutante IB67 fue restablecida por la complementación del gen que codifica para la enzima Ppm^{Sco} (figura 8, imagen 2) y también por el gen que codifica para el D2 de la enzima Ppm^{Mtu} (figura 8, imagen 3) lo cual demuestra que la actividad de la enzima Ppm es independiente de la enzima Lnt1 en *S. coelicolor*.

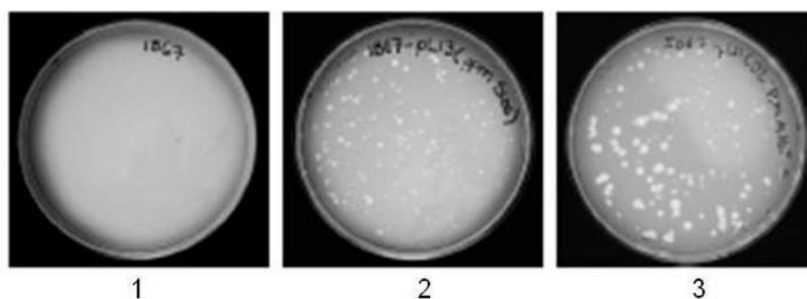


Figura 8. Efecto de la eliminación de los genes *ppm* (*sco1423*) y *lnt* (*sco1014*) de *S. coelicolor* y restauración de actividad catalítica con el dominio 2 de Ppm de *M. tuberculosis*. En la imagen 1 se observa la ausencia en la formación de placas en la doble mutante *S. coelicolor* $\Delta lnt1\Delta ppm$ (IB67) y restablecimiento de la glicosilación observado con la formación de placas en IB67 ($\Delta ppm \Delta lnt$) expresando la enzima Ppm de *S. coelicolor* (placa 2) e IB67 ($\Delta ppm \Delta lnt$) expresando el dominio 2 de la enzima Ppm de *M. tuberculosis* (placa 3). Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de placas del fago Φ C31 en todas las cepas.

Con base en esta observación y a la diferencia en el arreglo de los genes *lnt* y *ppm* entre *Mycobacterium spp.* y *Streptomyces spp.* (figura 9), nos preguntamos si se conserva la interacción proteína-proteína entre las enzimas Lnt1 y Ppm de *S. coelicolor* como ocurre con los homólogos de *M. tuberculosis* Lnt (D1) y Ppm (D2) de la enzima Ppm^{Mtu} (Baulard *et al.*, 2003).

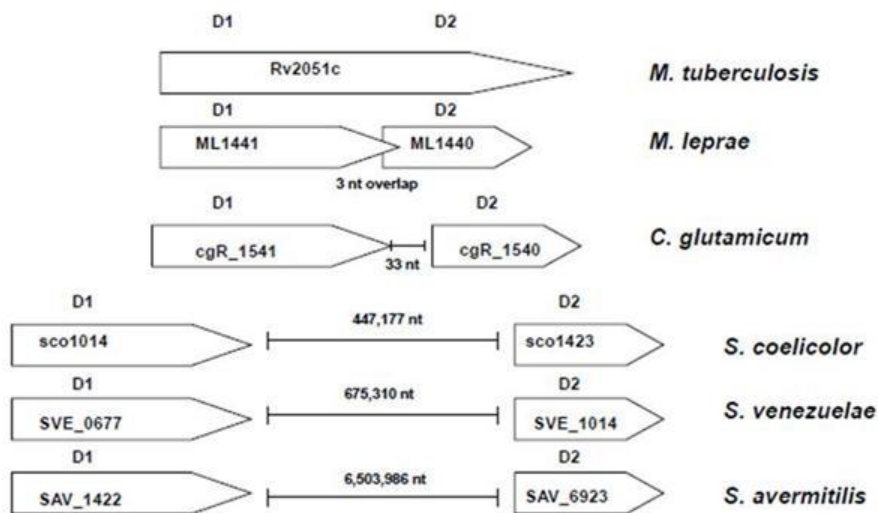


Figura 9. Arreglo genómico entre los genes que codifican para las enzimas Ppm y Lnt de varias especies del género *Mycobacterium spp.* y *Streptomyces spp.* Como se observa en la figura, en la Ppm de *M. tuberculosis* los dominios D1 (Lnt) y D2 (Ppm) están fusionados en una sola proteína, en *M. leprae* D1 y D2 están superpuestos 3 nt, en *C. glutamicum* D1 y D2 están separados por 33 nt y en el caso de *S. coelicolor*, *S. venezuelae* y *S. avermitilis* están separados por cientos de nucleótidos.

Para responder esta pregunta, los genes *lnt1* y *ppm* se clonaron en los plásmidos pKT25 y pUT28 respectivamente para quedar en fase con el fragmento correspondiente al gen *cya* (adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*) los cuales forman parte del sistema de doble híbrido de Karimova *et al*, 1998; pB18 y pB19 respectivamente, ver tabla 5) y se evaluó la interacción proteína-proteína a través de la actividad de la enzima β -galactosidasa en una mutante *cya* de *E. coli*; como control positivo de la interacción, el fragmento del gen *Rv2051c* correspondiente al D1 (Lnt) y el correspondiente al D2 (Ppm) de Ppm^{Mtu} también fueron clonados en los plásmidos pKT25 y pUT18 respectivamente (pBL16 y pBL17, tabla 5). Los dominios D1 y D2 de Ppm^{Mtu} interaccionaron como se evidenció al observar el incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa en las cepas que expresaban Lnt (pBL16) y Ppm (pBL17) de *M. tuberculosis*, comparados con los niveles de actividad basal observados con uno o ambos vectores vacíos (figura 10 (a)). Por otra parte, en las cepas que se expresaron Lnt1 (pBL18)

y Ppm (pBL19) de *S. coelicolor* no se observó un incremento de la actividad de la enzima β -galactosidasa respecto a la actividad basal de la enzima (figura 10 (b)), demostrando que las enzimas Lnt1 y Ppm de *S. coelicolor* no interactúan, resultado consistente con la observación de que la enzima Lnt1 es dispensable para la actividad catalítica de la enzima Ppm en *S. coelicolor*.

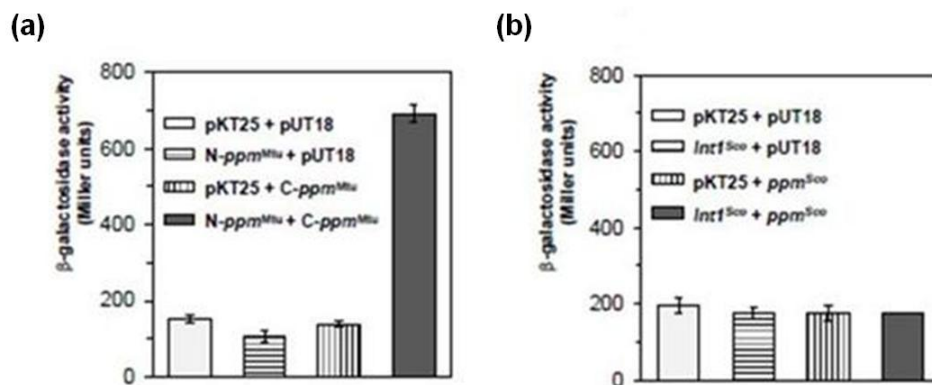


Figura 10. Análisis por doble híbrido de la interacción proteína-proteína de los dominios D1 (Lnt) y D2 (Ppm) de Ppm de *M. tuberculosis* y Lnt1 y Ppm de *S. coelicolor*. (a) Control positivo de interacción entre D1(Lnt) y D2 (Ppm) de la Ppm de *M. tuberculosis*. Interacción de pKT25-*lnt* + pUT18-*ppm* en *E.coli* Δ *cya*. Los resultados son el promedio de la actividad de la enzima β -galactosidasa expresada en unidades Miller de tres cultivos independientes. Las barras representan la desviación estándar. Sólo los dominios D1 (Lnt) y D2 (Ppm) de la enzima Ppm de *M. tuberculosis* muestran un incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa la cual es estadísticamente significativa respecto a los cultivos control ($P > 0.01$) determinado por la prueba *t*-Student. (b) Análisis por doble híbrido de la Interacción entre Lnt1 y Ppm de *S. coelicolor*. Interacción de pKT25-*lnt1* + pUT18-*ppm* en *E.coli* Δ *cya*, no se observa un incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa estadísticamente significativo. Las mediciones se realizaron de tres cultivos independientes.

8.4 La manosiltransferasa de proteínas de *S. coelicolor* es requerida para la glicosilación de la proteína Apa.

El gen *pmt* (*sco3154*) de *S. coelicolor* codifica una manosiltransferasa (Pmt^{Sco}), la cual es fundamental para infección del fago Φ C31 y para la glicosilación de la proteína PstS de *S. coelicolor* (Cowlshaw & Smith, 2001;

Wehmeier *et al.*, 2009).

La enzima Pmt^{Sco} es homóloga a la manosiltransferasa de proteínas de *M. tuberculosis* (Pmt^{Mtu}). Por lo tanto, se analizó la posibilidad de que la enzima Pmt^{Sco} de *S. coelicolor* fuera la responsable de manosilar a la proteína Apa de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*. Para demostrarlo, se obtuvo una mutante nula mediante el protocolo de mutagenesis PCR-targeting en el gen *pmt* de *S. coelicolor* (IB25), la cual fue verificada por PCR (figura 11).

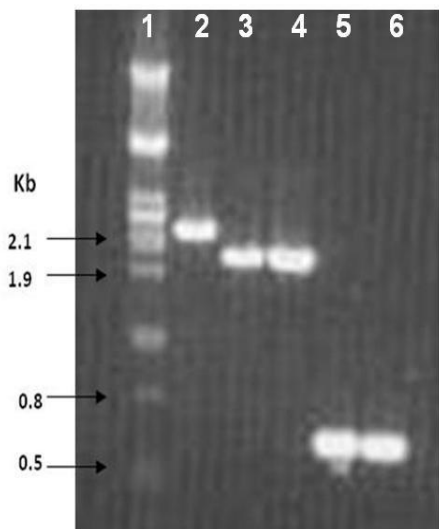


Figura 11. Verificación de la eliminación del gen *sco3154* (Pmt de *S. coelicolor*) por PCR. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular, el 2 al gen *sco3154* amplificado de la cepa silvestre (2.3 kilobases), los carriles 3 y 4 al gen *sco3154* mutado y substituido por el cassette de apramicina (1.8 kilobases) y los carriles 5 y 6 al gen *sco3154* mutado y substituido por los sitios FRT (cicatriz) (0.6 kilobases). Kb significa kilobases.

Al realizar el ensayo de glicosilación de proteínas utilizando al receptor del fago Φ C31 el cual se sabe está glicosilado, se observó que el fago Φ C31 fue incapaz de formar placas en la cepa IB25 (*S. coelicolor* Δ *pmt*) (figura 12, imagen 2); además, la proteína Apa expresada y colectada del sobrenadante de un cultivo de *S. coelicolor* Δ *pmt* (IB25) no se glicosiló, ya que la proteína no fue reconocida por la concanavalina A (figura 13 (b) carril 2), comparada con la misma proteína Apa obtenida de los sobrenadantes de la cepa silvestre (figura 13 (b) carril 1). Esto significa que la Pmt^{Sco} (la cual es responsable de la glicosilación del receptor del fago Φ C31 y la proteína PstS de *S. coelicolor*) también es responsable de glicosilar a la proteína heteróloga Apa de *M. tuberculosis*.

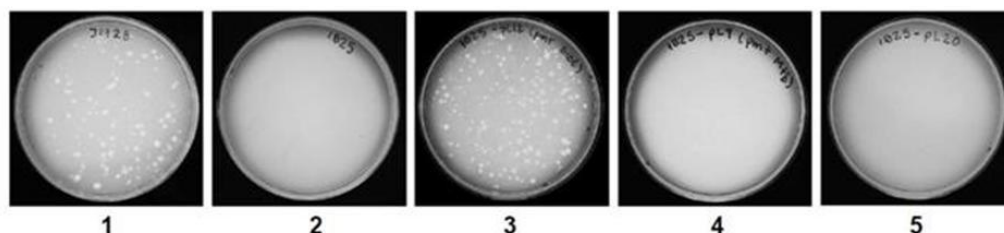


Figura 12. Efecto de la eliminación del gen *pmt* de *S. coelicolor* y restablecimiento de la glicosilación con su homólogo de *M. tuberculosis*. Formación de placas en *S. coelicolor* silvestre (1), IB25 (Δpmt) (2), IB25 complementada con pBL12 (expresa la Pmt de *S. coelicolor*), (3) IB25 complementada con pBL9 (expresa la Pmt de *M. tuberculosis*) (4) y como se observa, la Pmt de *M. tuberculosis* no es capaz de restablecer la actividad enzimática en *S. coelicolor* mutada en la *pmt* e IB25 complementada con pBL20 (químera 1) (5). Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de placas del fago $\Phi C31$ en todas las cepas.

La expresión heteróloga de la enzima Pmt^{Mtu} en *S. coelicolor* es particularmente importante en la síntesis de glicoproteínas micobacterianas en *Streptomyces*, ya que dicha enzima es responsable del reconocimiento de los sitios blancos de la glicosilación en la proteína; estudios recientes basados en la espectrometría de masas del glicoproteoma de *M. tuberculosis* han demostrado que las serinas o treoninas glicosiladas están rodeadas de prolinas y alaninas, y generalmente están localizadas en el extremo carboxilo (Smith, *et al.*, 2013). De tal forma, que en el caso de que hubiera diferencias en los patrones de glicosilación podrían ser debidos a un reconocimiento diferente de los sitios blancos de glicosilación por parte de las enzimas Pmt de *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*; así, la expresión de Pmt^{Mtu} en *S. coelicolor* produciría potencialmente proteínas micobacterianas recombinantes glicosiladas de manera similar a las producidas en *M. tuberculosis* pero con la ventaja de ser expresadas en una bacteria no patógena de uso industrial como lo es *S. coelicolor*.

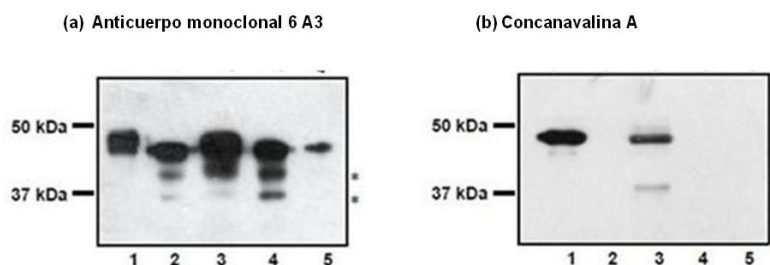


Figura 13. Efecto de la eliminación del gen *pmt* de *S. coelicolor* y restablecimiento de la glicosilación con su homólogo de *M. tuberculosis*. (a). Inmunodetección de Apa usando el anticuerpo monoclonal 6 A3 y **(b)** detección de la glicosilación usando concanavalina A en *S. coelicolor* (carril 1), IB25 (*S. coelicolor* Δ *pmt*) (carril 2), IB25 complementada con pBL12 (expresa la Pmt de *S. coelicolor*) (carril 3), IB25 complementada con pBL9 (expresa la Pmt de *M. tuberculosis*) (carril 4) e IB25 complementada con pBL20 (Químera 1) (carril 5).

Para responder la pregunta de si Pmt^{Mtu} es funcional en *S. coelicolor*, el gen *Rv1002c* (el cual codifica para Pmt^{Mtu}) fue amplificado por PCR y clonado en el vector pJ6902 donde su expresión está bajo el promotor *P_{tipA}* (un codón de leucina TTA fue remplazado por CTG a través de mutagénesis sitio dirigida para asegurar su traducción ya que TTA es un codón poco frecuente en *S. coelicolor*). Al realizar el ensayo de glicosilación con el fago Φ C31 no se observó la formación de placas en *S. coelicolor* *pmt* complementado con Pmt^{Mtu} (IB25-pBL9; figura 12, imagen 4) lo que sí ocurrió al expresar su propia Pmt^{Sco} (pBL12, ver figura 12, imagen 3). Para explicar esta observación, hipotetizamos que quizá la Pmt^{Mtu} sí era funcional en *S. coelicolor* pero su especificidad no le permitía reconocer a la proteína receptora del fago Φ C31. Por lo tanto, los plásmidos pBL9 y pBL12 que expresan los genes que codifican para las enzimas Pmt^{Mtu} y Pmt^{Sco} fueron introducidos en la cepa de *S. coelicolor* Δ *pmt* que expresa la proteína Apa. Sólo la proteína Apa expresada en la mutante *pmt* de *S. coelicolor* complementada con Pmt^{Sco} fue glicosilada (figura 13 **(b)** carril 3), mientras que la proteína Apa obtenida de los sobrenadantes del cultivo de *S. coelicolor* Δ *pmt* complementada con pBL9 (el cual expresa la enzima Pmt^{Mtu}) no se glicosiló (figura 13 **(b)** carril 4). Se observó un poco de degradación

proteica, lo cual fue más evidente en la proteína Apa que no está glicosilada (marcado con los asteriscos en la figura 13) debido a la alta actividad proteolítica de *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000; Jayapal *et al.*, 2007). Con base a estos experimentos podemos concluir que la Pmt^{Mtu} es incapaz de complementar la actividad de manosiltransferasa en la mutante de *S. coelicolor pmt*.

Al no observar actividad enzimática de Pmt^{Mtu} en la mutante de *S. coelicolor* Δ *pmt*, se pensó en la posibilidad de que la falta de complementación pudiera ser debido a que la enzima Pmt^{Mtu} no se localizara correctamente en la membrana de *S. coelicolor*.

Para evaluar esta posibilidad, se fusionó a las proteínas Pmt un epítipo de Hemaglutinina (HA) en el extremo carboxilo, tanto de Pmt^{Mtu} como de Pmt^{SCO} (como control positivo de localización membranal), dichas fusiones se realizaron mediante un PCR y se clonaron en el pIJ6902 donde su expresión está bajo el promotor *P_{tipA}* (pB14 y pBL15 respectivamente, tabla I). Ambos plásmidos fueron introducidos en la mutante de *S. coelicolor* Δ *pmt* (IB25) y después de la inducción de la expresión de los genes que codifican para las enzimas Pmt, el micelio fue centrifugado y sujeto a fraccionamiento celular para separar citoplasma y membrana celular; posteriormente se analizó por inmunorreplicas tipo *Western blot* y utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HA la expresión y localización de las enzimas Pmt de *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*. La enzima Pmt^{SCO}-HA fue localizada en la fracción membranal y no en el citoplasma (figura 14 a carriles 1 y 2). Se verificó que la Pmt de *S. coelicolor* fusionada al epítipo HA conservará su actividad catalítica, la cual fue evaluada a través de la glicosilación del receptor del fago Φ C31 (dato no mostrado). Al evaluar la expresión y localización de la enzima Pmt^{Mtu}-HA en la mutante de *S. coelicolor* Δ *pmt*, se observó que la enzima Pmt^{Mut} se expresó y se localizó en la membrana de *S. coelicolor* y no en el citoplasma

(figura 14 a carriles 3 y 4), lo que demostró que la enzima Pmt^{Mtu} está localizada correctamente en *S. coelicolor*. Por lo tanto, una localización incorrecta no fue la causa de la falta de glicosilación en la mutante de *S. coelicolor* Δpmt (IB25) complementada con Pmt^{Mtu}.

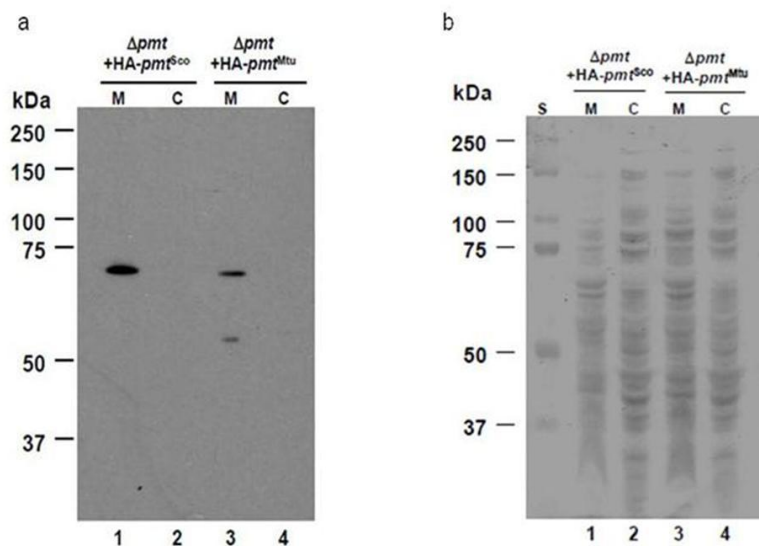


Figura 14. Localización de la enzima de Pmt^{Sco} y Pmt^{Mtu} en membranas de *S. coelicolor*. **a.** Inmunodetección por *Western Blot* de las enzima Pmt^{Sco} fusionada al epítoto HA obtenida de la fracción membranal (imagen a, carril 1) y la fracción citoplasmática (imagen a, carril 2) expresada en *S. coelicolor* Δpmt e inmunodetección de la enzima Pmt^{Mtu} fusionada al epítoto HA obtenida de la fracción membranal (imagen a, carril 3) y la fracción citoplasmática (imagen a, carril 4) expresada en *S. coelicolor* Δpmt . La detección se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal comercial anti-HA. **b.** Tinción azul de Coomassie como control de carga.

Aunque ambos genes están expresados a partir de un promotor fuerte de *Streptomyces*, la cantidad de la proteína Pmt^{Mtu} observada fue menor respecto a la enzima Pmt^{Sco} (para asegurar que no es un efecto de carga se muestra una tinción con azul de Coomassie como control; ver figura 14 b). Además, se observó un poco de degradación de la Pmt^{Mtu} expresada en la mutante *pmt* de *S. coelicolor*, hecho probablemente explicado por la gran cantidad de proteasas que secreta *Streptomyces coelicolor* (Jayapal *et al.*, 2007). Para descartar que la falta de actividad de Pmt^{Mtu} en *S. coelicolor* Δpmt era debida a una menor cantidad de proteína respecto a la Pmt^{Sco} se realizó un ensayo de restablecimiento de la glicosilación del receptor del fago Φ C31

con los niveles de expresión basales del promotor P_{tipA} . El resultado obtenido (figura 15) demostró que los niveles de expresión basales de Pmt^{Sco} fueron suficientes para complementar la actividad de manosiltransferasa en *S. coelicolor* Δpmt .

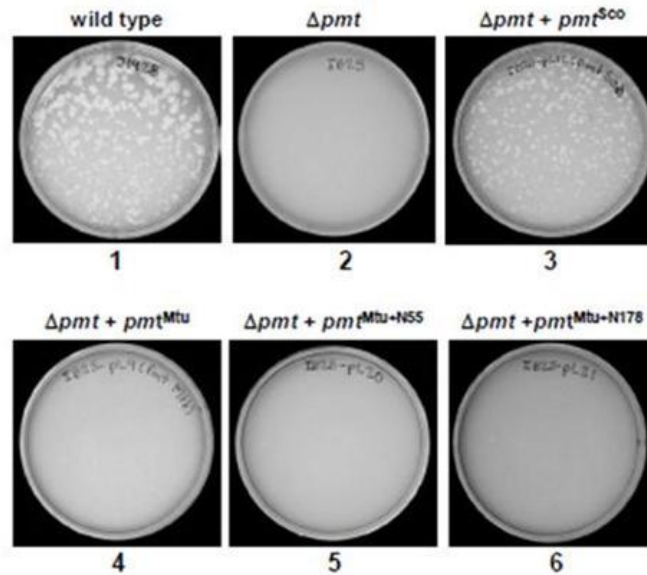


Figura 15. Ensayos de restablecimiento de la actividad catalítica de la Pmt de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor* Δpmt evaluada sólo con la expresión basal del promotor P_{tipA} . Formación de placas en *S. coelicolor* (1), IB25 (Δpmt) (2), IB25 complementada pBL12 (expresa la Pmt de *S. coelicolor*), (3) IB25 complementada con pBL9 (expresa la Pmt de *M. tuberculosis*) (4) IB25 complementada con pBL20 (química 1) (5) e IB25 complementada con pBL21 (química 2) (6). Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de placas del fago $\Phi C31$ en todas las cepas.

Los resultados obtenidos sugieren que existe una diferencia entre las enzimas Pmt^{Sco} y Pmt^{Mtu} que impiden la actividad de Pmt^{Mtu} en *S. coelicolor*. La manosilación de proteínas por Pmt^{Mtu} está asociada con la translocación vía Sec y se ha propuesto que se requiere una interacción física entre Pmt y Sec en la vía de glicosilación de proteínas (VanderVen *et al.*, 2005); por lo tanto, la incompatibilidad de la enzima Pmt^{Mtu} en la mutante pmt de *S. coelicolor*, podría ser explicada por una incompatibilidad entre la enzima Pmt

de *M. tuberculosis* y el sistema Sec de *Streptomyces*. Para determinar si existen diferencias importantes a nivel de secuencia proteica de las enzimas Pmt^{Mtu} y Pmt^{SCO}, se realizó un alineamiento (utilizando el programa ClustalW2 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) de la secuencia proteica de varias manosiltransferas de algunas especies de los géneros *Streptomyces spp.* y *Mycobacterium spp.*; el análisis del alineamiento mostró claras diferencias en el extremo amino-terminal entre las manosiltransferas del género *Streptomyces spp.* y las del género *Mycobacterium spp.* (anexo 1). Con base a predicciones topológicas de la estructura de las manosiltransferas de proteínas (Pmt) de *Saccharomyces cerevisiae*, el extremo amino-terminal está localizado en el lado citoplasmático de la célula (Lommel & Strahl, 2009). Esta región podría ser importante para la funcionalidad de la enzima Pmt de *S. coelicolor* (por ejemplo, podría ser requerida para interacción con Sec), por lo tanto, fueron creadas dos versiones modificadas del gen *Rv1002c* que codifican para proteínas quiméricas la cuales fueron clonadas en el vector pIJ6902. La primer quimera (pBL20, Tabla 5, anexo 2) corresponde a la fusión de los primeros 55 aminoácidos de la enzima Pmt^{SCO} al extremo amino-terminal de la Pmt^{Mtu}, la cual fue nombrada como Pmt^{Mtu+55}; la segunda quimera (pBL21, Tabla 5, anexo 2) corresponde a la fusión de los primeros 178 aminoácidos de Pmt^{SCO}, el cual incluye el primer loop extracelular donde están localizados aminoácidos importantes para la actividad catalítica (VanderVen *et al.*, 2005), región que sustituye a su equivalente en Pmt^{Mtu} (anexo 1). Al introducir pBL20 a *S. coelicolor* Δ *pmt* IB25, la quimera Pmt^{Mtu+55} no complementó la actividad de glicosilación evaluada a través del receptor del fago Φ C31 (figura 12, imagen 5) donde se observó que no hay formación de placas, por lo tanto el receptor no está glicosilado y el fago no puede infectar y lisar a *S. coelicolor*, ni a través de la glicosilación de la proteína Apa evaluada por el reconocimiento con concanavalina A (figura 13 (b) carril 5). Por lo tanto la quimera 1 Pmt^{SCO+55} no es funcional. Por otra parte, cuando pBL21 fue introducido a la mutante *pmt*

de *S. coelicolor* IB25, el micelio creció solamente bajo condiciones no inducidas (con la expresión basal del promotor P_{tipA}), y no complementó la actividad de glicosilación (figura 15, imagen 5); la adición de tioestrepton para inducir la expresión de la químera 2 (pBL21) resultó en un fenotipo de letalidad (figura 16), posiblemente por la formación de una proteína con un plegamiento aberrante que resulta tóxica a *S. coelicolor* o por una interacción entre la proteína quimérica y Sec que afectó la actividad de secreción de proteínas (Mirjam *et al.*, 2011). Intentamos demostrar la existencia de una interacción física entre proteínas del sistema Sec y la enzima Pmt de *S. coelicolor* a través del sistema de doble híbrido de Karimova *et al* (1998) pero no se obtuvieron resultados significativos (datos no mostrados).

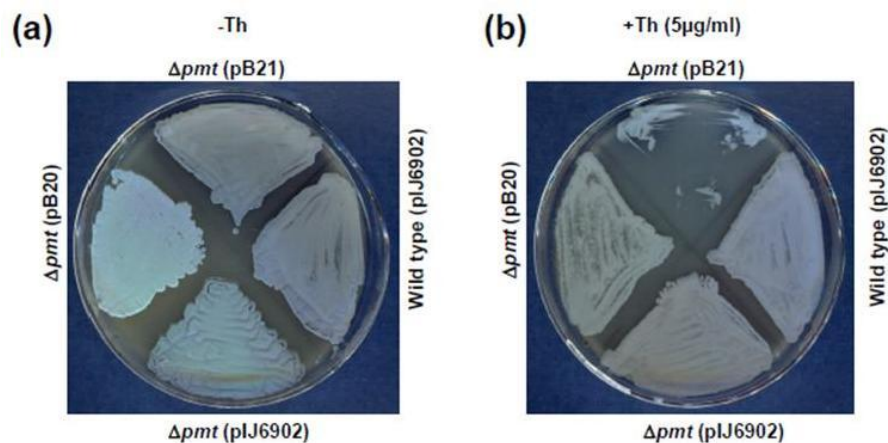


Figura 16. Expresión de la químera 1 y la químera 2 en *S. coelicolor* Δpmt en condiciones basales e inducidas. En la imagen (a) se observa el crecimiento en medio MS con apramicina a los cinco días a 30°C sin inducir la expresión las químeras. En la imagen (b) se observa el crecimiento en medio MS con apramicina a los cinco días a 30°C induciendo la expresión de las químeras 1 y 2 con 5μg/mL de tioestrepton. Como se aprecia, la expresión de la químera 2 en *S. coelicolor* Δpmt le resulta letal.

Estudios recientes han sugerido que la interacción entre las enzimas Pmt y Lnt de corinebacterias es esencial para la actividad de manosiltransferasa de proteínas, pues en ausencia de la enzima Lnt no se detectaba la glicosilación de lipoproteínas (Mohiman *et al.*, 2012). Las micobacterias están filogenéticamente relacionadas con las corinebacterias, por lo tanto, es

concebible la posibilidad de que Pmt^{Mtu} no fuera funcional en *S. coelicolor* porque es incapaz de interactuar con la enzima Lnt1 de *S. coelicolor*. Nuestros resultados revelan que la enzima Lnt1 no es necesaria para la actividad de Pmt^{SCO} en *S. coelicolor*, lo cual muestra una diferencia fundamental entre estos dos grupos bacterianos.

Al no observar actividad de la enzima Pmt^{Mtu} en *S. coelicolor* Δ *pmt* *in vivo*, consideramos la posibilidad de detectar la actividad enzimática realizando ensayos *in vitro* basados en estudios previos donde se utilizó al péptido A3 de la proteína Apa como sustrato de glicosilación y extractos membranales de *Mycobacterium smegmatis* (Cooper *et al.*, 2002). Como se observa en la figura 17 (a), el ensayo realizado utilizando la fracción membranaral de *S. coelicolor* silvestre demostró que fue la enzima Pmt^{SCO} fue capaz de manosilar al péptido A3 de la proteína Apa de *M. tuberculosis*, mientras con la fracción membranaral obtenida de la mutante *pmt* de *S. coelicolor* (IB25) no se observó manosilación del péptido A3. Al introducir el plásmido pBL12 que porta el gen que codifica para la enzima Pmt^{SCO} en *S. coelicolor* Δ *pmt* (IB25) la actividad *in vitro* fue restablecida, lo que no ocurrió al expresar la enzima Pmt^{Mtu} (figura 17 (b)).

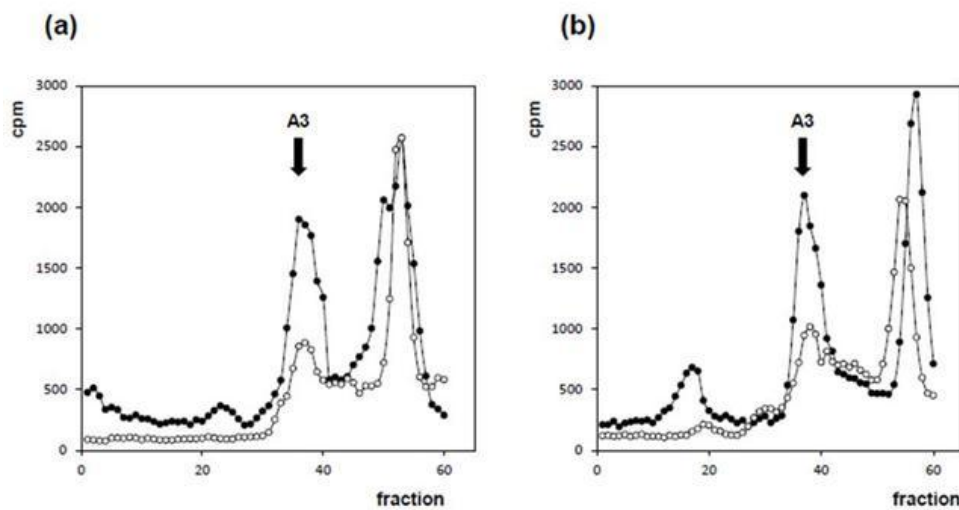


Figura 17. Manosilación del péptido A3 *in vitro*. Se observa el marcaje con GDP-[¹⁴C]-Manosa del péptido sintético después de 30 minutos de incubación a 37°C con extractos membranales de la cepa silvestre como control positivo (imagen **(a)**, círculos sólidos) donde sobresalen dos picos: de las fracciones 31 a 43 corresponden al péptido A3 y 48 a 60 corresponden a la marca radioactiva no incorporada. Como control negativo (imagen **(a)**, círculos vacíos) se usó un extracto membranal de la cepa IB25, la cual al estar mutada en la *pmt* endógena no manosila al péptido y sólo se observa el pico de las fracciones 48-60 que corresponden a la marca no incorporada. Al restablecer la actividad enzimática de *S. coelicolor* Δ *pmt* con la *Pmt* de *S. coelicolor* (imagen **(b)**, círculos sólidos) se observa el mismo patrón de dos picos que la cepa silvestre de las fracciones 31 a 43 corresponden al péptido A3 manosilado y las fracciones 48 a 60 corresponden a la marca radioactiva no incorporada. Al hacer el ensayo de restablecimiento de la actividad enzimática expresando la *pmt* de *M. tuberculosis* (imagen **(b)**, círculos vacíos) se observa sólo un pico de la fracción 48 a 60 la cual corresponde a la marca radioactiva no incorporada, igual que en la cepa mutada en el gen *pmt* (IB25) por lo que se concluye que la *Pmt* de *M. tuberculosis* no tiene actividad en *S. coelicolor*.

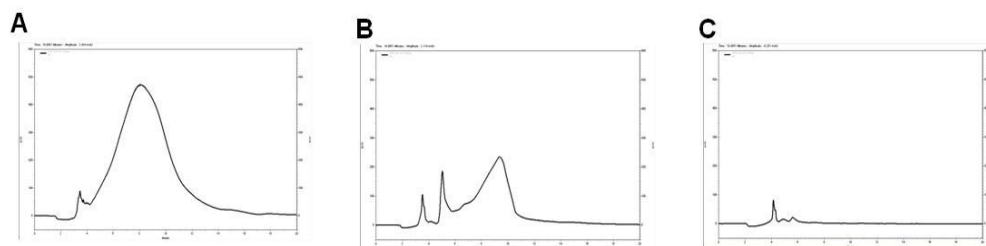


Figura 18. Demostración de la presencia del péptido A3 manosilado eluído de las fracciones 31 a 43 obtenidas del ensayo de manosilación *in vitro* analizadas por HPLC. La imagen A corresponde al péptido A3 estándar analizado el cual se observa entre los 4 y 12 minutos. La imagen B corresponde al péptido manosilado por la *Pmt* de *S. coelicolor* colectado en las fracciones 36 a 41. La imagen C corresponde a las fracciones 51 a 56 demostrando que el pico obtenido corresponde a la marca no incorporada y no al péptido manosilado.

Este resultado demostró que la enzima Pmt^{Mtu} , a pesar de ser expresada y localizada correctamente en la membrana de *S. coelicolor pmt* no es funcional en este organismo y reforzó la idea de que la enzima Pmt^{Mtu} no es capaz de formar una interacción productiva con el sistema Sec de *S. coelicolor* y que la interacción específica ya sea con el sistema Sec o con la enzima Lnt es necesaria para la actividad de la enzima Pmt^{Mtu} .

Como ha sido demostrado hasta este momento, la enzima Pmt^{Mtu} es altamente específica, lo que significa que la estrategia de expresar glicoproteínas de *M. tuberculosis* utilizando un organismo hospedero como lo

S. coelicolor, el cual posee un sistema de glicosilación homólogo, es más viable que intentar la expresión heteróloga del sistema de glicosilación de proteínas de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*.

9. CONCLUSIONES.

Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que la enzima Ppm de *M. tuberculosis* es funcional en *S. coelicolor*.

Además, la enzima Lnt1 de *S. coelicolor* es dispensable en la vía de glicosilación de proteínas y la enzima Pmt de *M. tuberculosis* no es funcional en *S. coelicolor* a pesar de que se expresa y se localiza en la membrana, probablemente debido a una incompatibilidad con el sistema Sec de *S. coelicolor*.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar la posibilidad de que la falta de actividad de la Pmt de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor* sea debida a la incompatibilidad entre la Pmt de *M. tuberculosis* con la Ppm y Lnt1 de *S. coelicolor*, pues tal vez es necesaria la formación de un complejo entre Ppm, Lnt1 y Pmt de *M. tuberculosis*.

Además, sería interesante analizar el mecanismo de glicosilación de lipoglicoproteínas de *M. tuberculosis* en *S. coelicolor*.

Alineamiento de la secuencia protéica de la enzima Pmt de algunas especies género *Streptomyces spp.* y *Mycobacterium spp.* utilizando el programa clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los aminoácidos que participan en la catálisis se encuentran conservados entre las Pmt los cuales corresponden a R39, D55, E56 y R119 (indicados con flechas). Los aminoácidos subrayados corresponden a los utilizados en la construcción de las quimeras, quimera 1 (Pmt^{55+Mtu}) corresponde a los primeros 55 aminoácidos de la Pmt de *S. coelicolor* y quimera 2 (Pmt^{178+Mtu}) corresponde a los primeros 178 aminoácidos de la Pmt de *S. coelicolor*. **SCO_3154** *Streptomyces coelicolor* A3 (2) NP_627370. **SAV_3592** *Streptomyces avermitilis* MA-4680 NP_824769. **SCAB_53791** *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 ZP_06911304. **SVEN_2974** *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 CCA56260. **Mtu_Rv1002c** *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NP_215518. **Mav_1126** *Mycobacterium avermitilis* A0QBU0. **Mle_0192c** *Mycobacterium leprae* TN Q9CD61.

12. Anexo 2. Tablas.

TABLA 2. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
BW 25113	$\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:}::\text{rrnB-3})$, $\lambda\text{-}$, rph-1 , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, hsdR514	Datsenko y Wanner (2000) Baba <i>et al.</i> , (2006)
DH5 α	F- $\text{endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG } \Phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169, hsdR17}(\text{rK- mK+})$, $\lambda\text{-}$	Meselson, 1968
SURE	$\text{endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- } \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$ F[$\text{proAB+ lacIq lacZ}\Delta\text{M15 Tn10}$	Stratagene
ET 12567 (pUZ8002)	$\text{dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM}$	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
IBEC58	$\Delta\text{dam } \Delta\text{dcm } \Delta\text{hsdRMS}$ derivative of BW25113.	González-Cerón <i>et al.</i> , 2009
CON1	W3110 $\Delta\text{cya-1400}$	Tellez-Sosa <i>et al.</i> , 2002
<i>Streptomyces coelicolor</i>		
M145	SCP1 $^-$, SCP2 $^-$	Hopwood <i>et al.</i> , 1985
J1928	pgY::aadA Pgl^-	Bedford <i>et al.</i> , 1995
IB11	M145 $\Delta\text{sco3154::FLP}$	Este trabajo
IB25	J1928 $\Delta\text{sco3154::FLP}$	Este trabajo
IB23	M145 $\Delta\text{sco1423::FLP}$	Este trabajo
IB31	J1928 $\Delta\text{sco1423::FLP}$	Este trabajo
	M145 $\Delta\text{sco1014::FLP}$	Este trabajo
IB65	J1928 $\Delta\text{sco1014::FLP}$	Este trabajo
	M145 $\Delta\text{sco1423}\Delta\text{sco1014::FLP}$	Este trabajo
IB67	J1928 $\Delta\text{sco1423}\Delta\text{sco1014::FLP}$	Este trabajo
IB23	M145 $\Delta\text{sco1423::FLP}$	Este trabajo
IB31	J1928 $\Delta\text{sco1423::FLP}$	Este trabajo
Bacteriofago		
$\Phi\text{C31 KC519}$	$\text{c}^- \text{ attP}^-$ derivado del actinofago ΦC31	Rodicio y Chater (1988)

TABLA 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencia
pIJ790	Sistema λ -RED, resistencia a cloranfenicol.	Gust <i>et al.</i> , 2002
pCP20	FLP recombinasa, inducible a 42°C.	Datsenko y Wanner, 2000
pIJ6902	<i>apra</i> ^R , promotor <i>tipA</i> , sitio <i>att</i> del fago Φ C31 en genoma de <i>Streptomyces</i>	Huang <i>et al.</i> , 2005
pRT802	<i>kan</i> ^R , sitio <i>att</i> del fago Φ BT1 en genoma de <i>Streptomyces</i>	Gregory <i>et al.</i> , 2003
pSET152	<i>apra</i> ^R , sitio <i>att</i> del fago Φ C31 en genoma de <i>Streptomyces</i>	Bierman <i>et al.</i> , 1992
pKT25	<i>kan</i> ^R , derivado de pACYC184 MCS en fase con los aminoácidos 1-224 de la adenilato ciclasa de <i>Bordetella pertusiss</i>	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18	<i>amp</i> ^R , derivado de pUC18 MCS en fase con los aminoácidos 225-399 de la adenilato ciclasa de <i>Bordetella pertusiss</i>	Karimova <i>et al.</i> , 1998

TABLA 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleotidos	Secuencia	Referencia
SCO3154FOR (mutación <i>pmt S. coelicolor</i>)	5'-GAACGTATCCGCACCCGGGAGGGCCATGCA CGGGACGTGATTCCG GGG ATC CGT-3'	Este trabajo
SCO3154REV (mutación <i>pmt S. coelicolor</i>)	3'-GGCGCTCCGCCGTGCCCTCATGACGGGCCC GGCCGGCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-5'	Este trabajo
SCO3154UP (Verificación de la mutación <i>pmt S. coelicolor</i>)	5'-GACTCGTTGCCCTCGAAGTA-3'	Este trabajo
SCO3154DOWN (Verificación de la mutación <i>pmt S. coelicolor</i>)	3'-TACTTGCCCCTGTTGTTTCGT-5'	Este trabajo
SCO1423 FOR (mutación <i>ppm S. coelicolor</i>)	5'-TTATGGTGGTAGGGGCAGTGATTCCGGGGA TCCGTCGACC-3'	Este trabajo
SCO1423 REV (mutación <i>ppm S. coelicolor</i>)	3'-TGCCTGGCCCCGGCTCAGTGCCGCATAAGA GGGCGGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-5'	Este trabajo
SCO1423B FOR (verificación de mutación <i>ppm S. coelicolor</i>)	5'-CATTGACCTCAAAGGTGCAG-3'	Este trabajo
SCO1423B REV (verificación de la mutación <i>ppm S. coelicolor</i>)	3'-AGGAGCAGGAAGACCATGAA-5'	Este trabajo
SCO1014FORred (mutación <i>Int1 S. coelicolor</i>)	5'-GTCCACGGCCAGGTCACCCGCCGTACACTC CGGGGGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'	Este trabajo
SCO1014REVred (mutación <i>Int1 S. coelicolor</i>)	3'-CCCGCCGTCGTCGCGGGGCGTGACCCGG GCGTACGGCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-5'	Este trabajo
SCO1014UP (Verificación de la mutación <i>Int1 S. coelicolor</i>)	5'-ACCGCGAGCAGCACAC-3'	Este trabajo
SCO1014DOWN (Verificación de la mutación <i>Int1 S. coelicolor</i>)	3'-AAGACGACGGCGGTGA-5'	Este trabajo
<i>Rv1002_FOR</i> (clonación del gen <i>Rv1002c</i> con su propio promotor)	5'-GACTCTAGAGAAGGGCCGTCACGC-3'	Este trabajo
<i>Rv1002_REV</i> (clonación del gen <i>Rv1002c</i> con su propio promotor)	3'-CGGATCCGCAGATCACCGCCAGCTGGG-5'	Este trabajo
mutTTA <i>Rv1002FOR</i> (cambio codón TTA por CTG en Leu22 del gen <i>Rv1002c</i>)	5'-CCCCTGGACCGGCTGCGCGGCTGGATC-3'	Este trabajo
mutTTA <i>Rv1002REV</i> (cambio codón TTA por CTG en Leu22 del gen <i>Rv1002c</i>)	3'-GATCCAGCCGCGCAGCCGGTCCAGGGG -5'	Este trabajo
mutag <i>Rv1002FOR</i> (Inserción sitio NdeI al inicio del gen <i>Rv1002c</i>)	5'-CCCGAGGAGCCTCATATGGTACCCGTCGTC- 3'	Este trabajo
mutag <i>Rv1002REV</i> (Inserción sitio NdeI al inicio del gen <i>Rv1002c</i>)	3'-GACGACGGGTACCATATGAGGCTCCTCGGG- 5'	Este trabajo

<i>Rv1002c</i>)		
<i>Rv2051FOR</i> (clonación del gen <i>Rv2051c</i> con su propio promotor)	5'-ACGCCGGGGACTTTGAC-3'	Este trabajo
<i>Rv2051REV</i> (clonación del gen <i>Rv2051c</i> con su propio promotor)	3'-CGTTCCATCGAAGAACTCG-5'	Este trabajo
mutNdel <i>Rv2051FOR</i> (eliminación de sitio interno Ndel del gen <i>Rv2051c</i>)	5'-GGCCGCGTGCATCTGCCTGGTCTTG-3'	Este trabajo
mutNdel <i>Rv2051REV</i> (eliminación de sitio interno Ndel del gen <i>Rv2051c</i>)	3'-CAAGACCAGGCAGATGCACGCGGCC-5'	Este trabajo
mutag <i>Rv2051FOR</i> (Inserción sitio Ndel al inicio del gen <i>Rv2051c</i>)	5'-CGCCGGCGCCTGCATATGAAGCTTGGCGCC-3'	Este trabajo
mutag <i>Rv2051REV</i> (Inserción sitio Ndel al inicio del gen <i>Rv2051c</i>)	3'-GGCGCCAAGCTTCATATGCAGGCGCCGGCG-5'	Este trabajo
MutagD2 <i>Rv2051FOR</i> : (inserción del sitio Ndel en el inicio del dominio catalítico D2 del gen <i>Rv2051c</i>)	5'-CATCGAGGAGTTACATATGACCACCGGCCA GCC-3'	Este trabajo
MutagD2 <i>Rv2051REV</i> (inserción del sitio Ndel en el inicio del dominio catalítico D2 del gen <i>Rv2051c</i>)	3'-GGCTGGCCGGTGGTCATATGTAACCTCTCG ATG-5	Este trabajo
<i>Sco3154UP</i>	5'-GACTCGTTGCCCTCGAAGTA-3'	Este trabajo
<i>Sco3154DOWN</i>	3'-TACTTGCCCCTGTTGTTTCGT-5'	Este trabajo
<i>SCO1423BFOR</i> (clonación del gen <i>sco1423</i> con su propio promotor)	5'-CATTGACCTCAAAGGTGCAG-3'	Este trabajo
<i>SCO1423BREV</i> (clonación de gen <i>sco1423</i> con su propio promotor)	3'-AGGAGCAGGAAGACCATGAA-5'	Este trabajo
<i>sco3154HAFOR</i> (clonación del gen <i>sco3154</i> fusionado con epítotope HA)	5'-CCCAAGCTTCATATGCACAGCGCGGTTCCC-3'	Este trabajo
<i>sco3154HAREV</i> (clonación del gen <i>sco3154</i> fusionado con epítotope HA)	3'-CGGTCTAGATCAGGCGTAGTCCGGGACGTC GTACGGGTAGCCGCCGACCCACGTGTGAGCC -5'	Este trabajo
<i>Rv1002cHAFOR</i> (clonación del gen <i>Rv1002c</i> fusionado con epítotope HA)	5'-CATTCTAGACATATGGTACCCGTCGTCAGC CC-3'	Este trabajo
<i>Rv1002cHARev</i> (clonación del gen <i>Rv1002c</i> fusionado con epítotope HA)	3'-CCGGGATCCTCAGGCGTAGTCCGGGACGTC GTACGGGTAGCCGCCCGCCAGCTGGGCAGC-5'	Este trabajo
DHNR <i>Rv2051FOR</i> (clonación del fragmento del gen que corresponde al dominio Lnt en pKT25)	5'-AAAAGTGCAGTGAAGCTTGGCGCCTGG-3'	Este trabajo
DHNR <i>Rv2051REV</i> (clonación del fragmento del gen que	3'-GCGGGATCCGTAACCTCTCGATGTTGCTCT GT-5'	Este trabajo

corresponde al dominio Lnt en pKT25)		
DHCRv2051FOR (clonación del fragmento del gen que corresponde al dominio Ppm en pUT18)	5'-GCTCTAGAAATGACCACCGGCCAGCC-3'	Este trabajo
DHCRv2051REV (clonación del fragmento del gen que corresponde al dominio Ppm en pUT18)	3'-CGGAATTCTTTTCGGTCACGTCCGGCG-5'	Este trabajo
DHSCO1014FOR (clonación del gen <i>sco1014</i> en pKT25)	5'-GGGCTGCAGTGACAGCCACCGCAACC-3'	Este trabajo
DHSCO1014REV (clonación del gen <i>sco1014</i> en pKT25)	3'-CCTCTAGACTACACGTACGGGCGC-5'	Este trabajo
DHSCO1423FOR (clonación del gen <i>sco1423</i> en pKT25)	5'-TGCCTGCAGGGTGAACGACGGCGACGG-3'	Este trabajo
DHSCO1423REV (clonación del gen <i>sco1423</i> en pKT25)	3'-GGGGGATCCGGGCCTTGGCGTCGGAC-5'	Este trabajo
QUIM1FORXbaI Ndel	5'-CATCTTAGACATATGCACAGCGCGGTTCCC-3'	Este trabajo
QUIM1REV Asp	3'-CGACGGGTACCACCAGCCGGTCGCG-5'	Este trabajo
QUIM2INTERev	3'-AACCGCCAGCCGAATCCCGGGTCGAAGCCG AAC-5'	Este trabajo
QUIM2BamHIREV	3'-CCCCGCTGCATGTCCGGATCCGC-5'	Este trabajo

TABLA 5. Construcciones realizadas en este trabajo.

Construcción.		
pL1	pRT802 con el gen <i>tsr</i> y gen Rv1860 (codifica para la proteína Apa de <i>M. tuberculosis</i> bajo el promotor <i>tip A</i>)	Este trabajo
pL9	pIJ6902 con el gen <i>Rv1002c</i> (<i>pmt</i> de <i>M. tuberculosis</i>) mutado en Leu22 TTA por remplazo con CTG clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL10	pIJ6902 con <i>Rv2051</i> (<i>ppm</i> de <i>M. tuberculosis</i>) clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL11	pIJ6902 con el Dominio2 del gen <i>Rv2051</i> (<i>ppm M. tuberculosis</i>) clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL12	pIJ6902 con el gen <i>Rv1002c</i> (<i>pmt</i> de <i>S. coelicolor</i>) clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL13	pSET152 con el gen <i>sco1423</i> (<i>ppm</i> de <i>S. coelicolor</i>) expresado desde su propio promotor.	Este trabajo
pL14	pIJ6902 con el gen <i>sco3154</i> (<i>pmt</i> de <i>S. coelicolor</i>) fusionado con el epítoto HA en el carboxilo clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL15	pIJ6902 con el gen <i>Rv1002c</i> (<i>pmt</i> de <i>M. tuberculosis</i>) fusionado con el epítoto HA en el carboxilo clonado bajo el promotor de P _{tipA}	Este trabajo
pL16	pKT25 con la parte del gen <i>Rv2051c</i> que codifica para el dominio Lnt (Met1-Tyr593) de <i>M. tuberculosis</i> .	Este trabajo
pL17	pUT18 con la parte del gen <i>Rv2051c</i> que codifica para el dominio Ppm (Met594-Glu874) de <i>M. tuberculosis</i>	Este trabajo
pL18	pKT25 con el gen <i>sco1014</i> (<i>Int1</i>)de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo
pL19	pUT18 con el gen <i>sco1423</i> (<i>ppm</i>) de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo
Quimera 1: pL20	pIJ6902 clonado bajo el promotor de P _{tipA} con los primeros 55 aa del gen <i>sco3154</i> (<i>pmt</i> de <i>S. coelicolor</i>) fusionados al gen <i>Rv1002c</i> (<i>pmt</i>) de <i>M. tuberculosis</i>	Este trabajo
Quimera 2: pL21	pIJ6902 clonado bajo el promotor de P _{tipA} con el gen <i>Rv1002c</i> modificado por remplazo del extremo amino y primer loop extracelular del gen <i>sco3154</i> que codifica para la proteína Pmt de <i>S. coelicolor</i>	Este trabajo

13. Anexo 3. Medios y soluciones

Medio Manitol-Soya

Para 1 Litro:

Manitol.....20 gr
 Harina de soya.....20 gr
 Agua de la llave..... 1 Lt
 Agar 1.5 gr por cada 100 mL

Medio SOB

Para 1 Litro:

Triptona..... 20 gr
 Extracto de levadura..... 5 gr
 NaCl.....0.5 gr
 KCl 250mM Stock.....10 mL
 Ajustar a pH=7 con NaOH 1M
 Agua desionizada.....1 Lt

Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH=8

Para 100 mL:

Tris 1M Stock 2.5 mL
 EDTA 0.5 M pH=8..... 5 mL
 Agua desionizada.....aforar a 100 mL
 Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH=8

Para 100 mL:

Tris 1M Stock 1 mL
 EDTA 0.5 M pH=8..... 20 μ L
 Agua desionizadaaforar a 100 mL
 Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Acetato de potasio 3M pH=4.8

Para 100 mL:

Acetato de potasio.....29.442 gr
 Agua Milli-Q.....15 mL
 Ácido acético glacial..... 80 mL
 Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Acetato de sodio 4M pH=6

Para 100 mL:

Acetato de potasio.....32.812 gr
 Agua Milli-Q.....50 mL
 Ácido acético glacial.....para ajustar el pH
 Agua desinoizada.....aforar a100 mL
 Esterilizar a 121°C por 15 minutos..

Acetato de sodio 3M pH=6

Para 100 mL:

Acetato de potasio.....24.609 gr
 Agua Milli-Q.....50 mL
 Ácido acético glacial.....para ajustar el pH
 Agua desinoizada.....aforar a100 mL
 Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Soluciones para transformar a *S. coelicolor* por protoplastos.**Medio YEME**

Para 100 mL:

Extracto de levadura0.3 gr
 Peptona.....0.5 gr
 Extracto de Malta.....0.3 gr
 Glucosa.....1 gr

Sacarosa.....34 gr
 Agua desionizada.....aforar a100 mL
 Disolver y ajustar a pH=7.

Después de esterilizar, al momento de usar adicionar a 25 mL:

MgCl₂ -6 H₂O 1M (Stock).....0.125 mL
 Glicina 10% (Stock).....1.25 mL

CaCl₂ 3.86%

CaCl₂3.86 gr
 Agua desionizada.....100 mL

Tris-HCl 3%

Tris3 gr
 Agua desionizada.....100 mL
 Ajustar pH=7.2 con HCl y aforar a un volumen final de 100 mL

Agar suave

Para 100 mL

Sacarosa.....10.3 gr
 MgCl₂ -6 H₂O.....1.012 gr
 Tris 3% pH=7.2.....10 mL
 CaCl₂ 5M.....0.4 mL
 Agua desionizada aforar a.....100 mL
 Dividir en dos frascos de 50 mL cada uno y agregarle 0.325 gr de Difco Agar.

Medio R2

Para 800 mL

Sacarosa.....103 gr
 K₂SO₄.....0.25 gr
 MgCl₂-6H₂O.....10.12 gr
 Glucosa.....10 gr
 Casaminoácidos.....0.1 gr
 Agua desionizada aforar a800 mL

Pesar 2.2 gr de Bacto-Agar (Difco) en botellas y añadir 80 mL de solución base, esterilizar.

Al momento de utilizar el medio, suplementar con:

KH ₂ PO ₄ (Stock 0.5%).....	1 mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (3.86%).....	8 mL
L-Prolina (20%).....	1.5 mL
Tris-HCl (3%, pH=7.2).....	10 mL
Elementos traza	0.2 mL
CuSO ₄ 2 mM.....	0.2 mL
NaOH 1N.....	0.2 mL
Extracto de levadura (Stock 10%).....	5 mL

Al suplementar dejar secar las cajas por 5 horas para que regeneren los protoplastos.

Amortiguador P

Para 800 mL

Sacarosa.....	103 gr
MgCl ₂ -6H ₂ O.....	2.02 gr
K ₂ SO ₄	0.25 gr
Agua desionizada, aforar a.....	800 mL

Distribuir en botellas con 40 mL cada una y esterilizar.

Al momento de usar, suplementar mínimo media hora antes de empezar la transformación con:

Para 40 mL:

Elementos traza.....	100 µL
KH ₂ PO ₄ (Stock 0.5%).....	0.5 mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (3.86%).....	.5 mL
Tris-HCl (3%, pH=7.2).....	5 mL

Colorante de carga 5X para ADN

Sacarosa	6 gr
Azul de Bromofenol.....	0.025 gr
Xilencianol.....	0.025 gr
EDTA (0.5 M pH=8).....	0.2 mL
Agua desionizada aforar a.....	10 mL

Disolver la sacarosa en 3 mL de agua caliente y agregar EDTA, ajustar a 10 mL. Esterilizar

IPTG 100 mM

IPTG..... 0.0477 gr
 Agua desionizada..... 2 mL
 Disolver y esterilizar pasando por filtros de 0.45 micras.

X-galactosa 20mg/ml

X-galactosa.....0.040 gr
 Dimetilformamida (DMFM)..... 2 mL

Medio mínimo M14

Para 1 Litro

KH_2PO_4 1 gr
 K_2HPO_4 5.5 gr
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 gr
 Tween 80..... 2 mL
 Fuente de carbono.....1%
 Metales traza..... 1 mL
 Agua desionizada, aforar a..... 1 Lt

Composición de metales traza

Para 100 mL

FeSO_4 0.5 gr
 MnSO_40.16 gr
 ZnSO_4 0.14 gr
 CONH_3 0.2 gr

Antes de usar el medio suplementar con MgSO_4 al 5% y CaCl_2 3%.

Las fuentes de carbono se prepararon en Stock al 20% cada una.

Glucosa.....20 gr en 100 mL de agua desionizada
 Manitol.....20 gr en 100 mL de agua desionizada
 Peptona.....20 gr en 100 mL de agua desionizada

Medio Mínimo NMMP

Para 1 Litro

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr
Difco Casaminoácidos	5 gr
MgSO ₄	0.6 gr
Azúcar (25%).....	250 gr
Agua desionizada, aforar a.....	1 Lt

Al momento de usar, suplementar con:

NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ (0.1M, pH=6.8).....	1.5 mL
Glucosa al 1% (Stock al 20%).....	20 mL
Elementos trazas.....	200 µL
Antibiótico correspondiente kanamicina o apramicia	

Elementos trazas

Solución Stock 10 mL

ZnCl ₂	400 mg
FeCl ₃ - 6H ₂ O.....	2000 mg
CuCl ₂ - 2H ₂ O.....	100 mg
MnCl ₂ - 4H ₂ O.....	100 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ - 10H ₂ O.....	100 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ - 4H ₂ O.....	100 mg

Preparación de NaH₂PO₄/K₂HPO₄ (0.1M cada uno, pH=6.8)

Para 200 mL:

K ₂ HPO ₄	3.484 gr
NaH ₂ PO ₄	2.768 gr
Agua desionizada, aforar a.....	200 mL

Disolver y ajustar pH=6.8, aforar a 200 mL y esterilizar

Medio LB

Para 1 Litro

Triptona.....	10 gr
Extracto de levadura.....	5 gr
NaCl.....	10 gr
Agua desionizada, aforar a	1 Lt

Disolver y ajustar el pH= 7

Si el cultivo es para crecer *Streptomyces coelicolor*

Agregar como dispersante, agregar sacarosa al 25%

PBS 5X

Para 1 Litro

NaCl.....	40 gr
KCl.....	1 gr
Na ₂ HPO ₄	7.2 gr
KH ₂ PO ₄	1.2 gr
Agua desionizada aforar a.....	1 Litro

Disolver en 800 mL y ajustar el pH= 7.4, aforar a 1 Litro.

TBS (Amortiguador Tris-Sal, pH=7.5)

Para 1 Litro

Tris Base (50mM).....	6.05 gr
NaCl (150 mM).....	8.76 gr
Agua desionizada aforar a.....	1 Litro

Disolver en 800 mL y ajustar el pH= 7.5, aforar a 1 Litro.

Si es necesario, agregar Tween 20 al 0.05% al final.

Medio YT2X

Para 1 Litro

Bactotriptona.....	16 gr
Extracto de levadura.....	10 gr
Cloruro de Sodio.....	5 gr
Agua desionizada, aforar a	1 Lt

Disolver y ajustar el pH= 7.2

Reactivo de Bradford

Para 1 Litro

Azul de Commassie G-250.....	100 mg
Etanol al 95%.....	50 mL
Ácido fosfórico al 85%	100 mL
Agua desionizada, aforar a	900 mL

Solución de semi-purificación de la APA

Se prepara al momento de usar (no almacenar):

Para 2 Litros:

Ácido acético 0.2 M.....	280 mL
Acetato de Sodio 0.2 M.....	704 mL

Al hacer la mezcla el pH debe quedar a pH=5. Aforar a 2 Litros con agua Milli-Q.

Preparación de ácido acético 0.2 M

Ácido acético.....	12.01 mL
Agua desionizada, aforar a	1 Litro

Preparación de acetato de sodio 0.2 M

Acetato de sodio.....	16.406 gr
Agua desionizada, aforar a	1 Litro

Almacenar las soluciones a 4°C.

Solución para obtención de membranas de *S. coelicolor* para ensayo de localización proteica.

MOPS 1M

MOPS	20.93 gr
Agua desionizada, aforar	100 mL

Ajustar al pH=8 con perlas de Hidróxido de Potasio.

Para sonicar, Solución A

Para 30 mL

MOPS 50mM.....	1.5 mL (Stock 1M)
β -mercaptoetanol.....	11.72 μ L
MgCl ₂ 10 mM.....	0.3 mL (Stock 1M)
Agua desionizada.....	28.2 mL

Amortiguador Z (ensayo de actividad de β -galactosidasa)

Para 500 mL

Na ₂ HPO ₄	4.25 gr
NaH ₂ PO ₄	2.76 gr
KCl.....	0.3727 gr
MgSO ₄	0.123 gr
Agua desionizada, aforar a	500 mL

Pesar y disolver, ajustar el pH=7, aforar y almacenar a 4°C.

Amortiguador Z con β -mercaptoetanol (ensayo de actividad de β -galactosidasa)

Para 3 mL de amortiguador Z agregar 8 μ L de β -mercaptoetanol.

Se prepara al momento de usarse.

Na₂CO₃ 1 M (ensayo de actividad de β -galactosidasa)

Na ₂ CO ₃	2.12 gr
Agua desionizada.....	20 mL

ONPG 4 mg/mL (ensayo de actividad de β -galactosidasa)

ONPG.....	0.02 gr
Amortiguador Z sin β -mercaptoetanol	5 mL

Disolver y cubrir de la luz con papel aluminio. Almacenar a -20 °C.

NaCl 0.8% (ensayo de actividad de β -galactosidasa)

NaCl..... 0.8 gr
 Agua desionizada..... 100 mL

Acrilamida:bis-acrilamida 29:1

Para 100 mL

Acrilamida.....29 gr
 Bis-Acrilamida.....1 gr
 Agua desionizada, aforar a.....100 mL
 Filtrar antes de usar, cubrir de la luz.

Tris 1.5 M pH=8.8

Tris base.....18.16 gr
 Agua desionizada, aforar a100 mL
 Ajustar pH =8.8 con HCl concentrado.

Tris 0.5 M pH=6.8

Tris base.....6.05 gr
 Agua desionizada, aforar a100 mL
 Ajustar pH =6.8 con HCl concentrado

Solución de tratamiento 2X

(0.125 M Tris-HCl pH= 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%)

Tris-HCl pH= 6.82.5 mL
 SDS 10%..... 4 mL
 Glicerol.....2 mL
 2-mercaptoetanol.....1 mL
 Agua bidestilada..... 0.5 mL
 Azul de bromofenol.....0.0005 gr
 Volumen total.....10 mL
 Dividir en alícuotas y congelar.

Amortiguador de corrida 5X SDS-PAGE

Tris base.....	15.1 gr
Glicina.....	94 gr
SDS.....	5 gr
Agua desionizada, aforar a	1 Litro

Soluciones para tinción con Azul de Coomasiee**Stock Azul de Commassie R-250 1%**

Azul de Commassie R-250.....	2 gr
Agua desionizada, aforar a	200 mL

Solución de Tinción Commassie

Stock Azul de Commassie R-250 1%.....	12.5 mL
Metanol.....	50 mL
Ácido acético.....	10 mL
Agua bidestilada.....	27.5 mL
Volumen final.....	100 mL

Solución de Desteñido I

Metanol.....	50 mL
Ácido acético.....	10 mL
Agua bidestilada.....	40 mL
Volumen final.....	100 mL

Solución de Desteñido II

Metanol.....	5 mL
Ácido acético.....	7 mL
Agua bidestilada.....	88 mL
Volumen final.....	100 mL

14. BIBLIOGRAFÍA.

- Aebi M. 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833: 2430–2437.
- Anné J., Maldonado B., Van Impe J., Van Mellaert L., Bernaerts K. 2012. Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of Biotechnology* 158: 159–167.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L. and Mori H.. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0008.
- Baulard A. R., Gurcha S. S., Engohang-Ndong J., Gouffi K., Loch C. and Besra G. S.. 2003. In Vivo Interaction between the Polyprenol Phosphate Mannose Synthase Ppm1 and the Integral Membrane Protein Ppm2 from *Mycobacterium smegmatis* Revealed by a Bacterial Two-hybrid System. *The journal of biological chemistry* 278 (4): 2242–2248.
- Bedford D.J., Laity C. and Buttner M. 1995. Two genes involved in the phase-variable Φ C31 resistance mechanism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 177: 4681–4689.
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N. and Schoner B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* *Gene* 116(1):43-9.
- Cascioferro A., Delogu G., Colone M., Sali M., Stringaro A., Arancia G., Fadda G., Palù G. and Manganeli R. 2007. PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Mol Microbiol* 66: 1536-1547.
- Chinenova T.A., Mkrtumian N.M., and Lomovskaia N.D. 1982. Genetic characteristics of a new phage resistance trait in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genetika* 18: 1945–1952.

- Cooper H.N., Gurcha S.S., Nigou J., Brennan P.J., Belisle J.T., Besra G.S. and Young D. 2002. Characterization of mycobacterial protein glycosyltransferase activity using synthetic peptide acceptors in a cell-free assay. *Glycobiology* 12(7):427-34.
- Cowlshaw D. A. and Smith M. C. M.. 2001. Glycosylation of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) cell envelope protein is required for infection by Bacteriophage ϕ C31. *Molecular Microbiology* 41(3): 601–610.
- Cowlshaw D. A. and Smith M. C. M.. 2002. A gene encoding a homologue of dolichol phosphate- β -D-mannose synthase is required for infection of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phage Φ C31. *Journal of Bacteriology*. 184(21): 6081–6083.
- Datsenko K.A. and Wanner B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97: 6640-5.
- Dobos K., Khoo K., Swiderek K., Brennan P. and Belisle J. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 178(9): 2498–2506.
- Espitia C., Servín-González L. and Mancilla R. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Mol. BioSyst.* 6: 775–781.
- Gibson K. J. C., Eggeling L., Maughan W.N., Krumbach K., Gurcha S. S., Nigou J., Puzo G., Sahm H., and Besra G. S.. 2003. Disruption of Cg-Ppm1, a Polyprenyl Monophosphomannose Synthase, and the Generation of Lipoglycan-less Mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(42): 40842–40850.
- Gregory M.A., Till R. and Smith M.C. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage ϕ iBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol* 185(17): 5320-3.
- González-Cerón G., Miranda-Olivares O.J. and Servín-González L. 2009. Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol Lett* 301(1): 35-43.

- González-Zamorano M., Mendoza-Hernández G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A. J., Bigi F. and Espitia C.. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-Lectin affinity capture of mannosylated proteins. *Journal of Proteome Research* 8: 721–733.
- Gurcha S., Baulard A., Kremer L., Locht C., Moody D., Muhlecker W., Costello C., Cricks D., Brennans P. and Besra G. 2002. Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* 365: 441-450.
- Gust B., Kieser T. and Chater K.F. 2002. REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. *John Innes Centre.* 1-39.
- Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T. and Chater K.F. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci* 100(4): 1541-6.
- Hopwood D., Bibb M., Chater K., Kieser T., Brunton C. and Kieser H. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual.* Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- Horn C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O. and Marchal G. 1999. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to change in the mannoseylation pattern. *J Bacteriol* 171(24): 7223–7230.
- Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg B., Weaver D., Bibb M.J., Karoonuthaisiri N., Lih C.J., Kao C.M., Buttner M.J. and Cohen S.N. 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 58: 1276-1287.
- Iwashkiw J. A., Voza N. F., Kinsella R. L. and Feldman M. F. 2013. Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation. *Mol Microbiol* 89 (1): 14-28.

- Jayapal K.P., Lian W., Glod F., Sherman D.H. and Hu W.S. 2007. Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics* 8:229: 1-12.
- Julenius K., Molgaard A., Gupta R., and Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153–164.
- Karimova G., Pidoux J., Ullmann A. and Ladant D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5752–5756.
- Karimova G., Ullmann A. and Ladant D. 2000. A bacterial two-hybrid that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* 328: 59-73.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Kim D.W., Chater K.F., Lee K.J. and Hesketh A. 2005. Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol* 151: 2707-2720.
- Klepp L.I., Soria M., Blanco F.C., Bianco M.V., Santangelo M.P., Cataldi A.A. and Bigi F. 2009. Identification of two proteins that interact with the Erp virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis* by using the bacterial two-hybrid system. *BMC Mol Biol* 10:3.
- Kowarik M., Young N. M., Numao S., Schulz B. L., Hug I., Callewaert N., Mills D. C., Watson D. C., Hernandez M., Kelly J. F., Wacker M. and Aebi M. 2006. Definition of the bacterial *N*-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J* 25: 1957–1966.
- Lara M., Servín-González L., Singh M., Moreno C., Cohen I., Nimtz M. and Espitia C. 2004. Expression, Secretion, and Glycosylation of the 45- and 47-kDa Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 679–685.

- Lizak, C., Gerber, S., Numao, S., Aebi, M., and Locher, K. P. (2011) X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature* 474, 350–355
- Lommel M, Strahl S. 2009. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 19(8): 816-28.
- Ludwig L, Strahl S, Tanner W. 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *AngewChemInt* 45: 6802 – 6818.
- MacNeil D.J., Gewain K.M., Ruby C.L., Dezeny G., Gibbons P.H. and MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111(1): 61-8.
- Matthew A. Gregory, Rob Till, and Smith M. C. M.. 2003. Integration Site for *Streptomyces* Phage BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *Journal of Bacteriology* 185 (17): 5320-5323.
- Meselson M. and Yuan R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217(5134): 1110-4.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor pp. 352-355
- Mirjam M. Klepscha, Jan O. Perssonb, and Jan-Willem L. de Giera. 2011. Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor in *Escherichia coli*. *Mol Biol* 407(4): 532–542.
- Mo C., M. Valachovic, S. K. Randall, J. T. Nickels, and M. Bard. 2002. Protein–protein interactions among C-4 demethylation enzymes involved in yeast sterol biosynthesis. *PNAS* 99(15): 9739–9744.
- Mohiman N., Argentini M., Batt S., Cornu D., Masi M., Eggeling L., Besra G., N. Bayan. 2012. The ppm operon is essential for acylation and glycosylation of lipoproteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Plos one* 9(7): 1-14.

- Nothaft H., Liu X., McNally D. J., Li J. and Szymanski C. M. 2009. Study of free oligosaccharides derived from the bacterial *N*-glycosylation pathway. PNAS 106: 15019–15024.
- Olivier N. B., Chen M. M., Behr J. R. and Imperiali B. 200. *In vitro* biosynthesis of UDP-*N,N*-diacetylbacillosamine by enzymes of the *Campylobacter jejuni* general protein glycosylation system. Biochemistry 45: 13659–13669.
- Pitarque S., Herrmann J.L., Duteyrat J.L. , Jackson M. , Stewart G.R., Lecoïnte F., Payre B., Schwartz O., Young D.B., Marchal G., Philippe H. L., Puzo G., Gicquel B., Nigou J. and Neyrolles O. 2005. Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. Biochem J 392: 615–624.
- Redenbach M., Kieser H.M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H., Hopwood D.A. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol Microbiol 21(1): 77-96.
- Rodicio M.R. and Chater K.F. 1988. The Sall (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. Gene 74: 39–42.
- Sambrook J & Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt MA, Riley LW, Benz I. 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. Trends Microbiol 11(12): 554-561.
- Scott N. E., Parker B. L., Connolly A. M., Paulech J., Edwards A. V., Crossett B., Falconer L., Kolarich D., Djordjevic S. P., Højrup P., Packer N. H., Larsen M. R. and Cordwell, S. J. 2011 Simultaneous glycan peptide characterization using hydrophilic interaction chromatography and parallel fragmentation by CID, higher energy collisional dissociation, and electron transfer dissociation MS applied to the *N*-linked glycoproteome of *Campylobacter jejuni*. Mol. Cell. Proteomics 10: M000031-MCP201.
- Shrimal S. and Gilmore R. 2013. Glycosylation of closely spaced acceptor sites in human glycoproteins. J Cell Sci 126: 5513-5523.

- Smith G.T., Sweredoski M.J. and Hess S. 2013. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *J Proteomics* 97: 296-306.
- Sonawane A., Mohanty S., Jagannathan L., Bekolay A. and S. Banerjee. 2012. Role of glycans and glycoproteins in disease development by *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical Reviews in Microbiology*: 1–17.
- Strahl S., Gentsch M., Tanner W. 1999. Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426(2): 297 – 307.
- Szymanski C, Logan S, Linton D, Wren B. 2003. *Campylobacter* – a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol* 11 (5): 233-238.
- Szymanski CM, Wren BW. 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *3*: 225-237.
- Tellez-Sosa J., Soberon N., Vega-Segura A., Torres-Marquez M.E. and Cevallos MA. 2002. The *Rhizobium etli* cyaC product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol* 184: 3560–3568.
- Towbin H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76: 4350–4354.
- Tschumi A., Nai C., Auchli Y., Hunziker P., Gehrig P., Keller P., Grau T. and Sander P. 2009. Identification of apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) in mycobacteria. *J Biol Chem* 284 (40): 27146-27156.
- VanderVen B, Harder J, Crick D, Belisle J. 2005. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* 309: 941-943.
- Wacker M., Linton D., Hitchen P. G., Nita-Lazar M., Haslam S. M., North S. J., Panico M., Morris H. R., Dell A., Wren B. W. and Aebi, M. 2002. N-Linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 298:1790–1793.

- Wacker M., Feldman M. F., Callewaert N., Kowarik M., Clarke B. R., Pohl N. L., Hernandez M., Vines E. D., Valvano M. A., Whitfield C. and Aebi M. 2006. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *PNAS* 103: 7088–7093.
- Wehmeier S., A. S. Varghese, S. S. Gurcha, B. Tissot, M. Panico, P. Hitchen, H. R. Morris, G. S. Besra, A. Dell and Smith M. C. M.. 2009. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes. *Molecular Microbiology* 71(2): 421–433.
- Wessel D. and Flügge U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1):141-3.
- Widdick D., Hicks M., Thompson B., Tschumi B., Chandra A, Sutcliffe I., Brülle J., Sander P., Palmer T. and Hutchings M.. 2011. Dissecting the complete lipoprotein biogenesis pathway in *Streptomyces scabies*. *Molecular Microbiology* 80(5): 1395–1412.